

Roselinde Fock-Nützel

STUDIEN
ZUR PRIMÄRSTRUKTUR
DES EBERAKROSINS

Diss. München

1903



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0017

STUDIEN ZUR PRIMÄRSTRUKTUR DES EBERAKROSINS

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Roselinde Fock-Nützel

München

Juni 1983

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Braunitzer und
Prof. Dr. H. Wagner

Tag der mündlichen

Prüfung: 20. Oktober 1983

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München unter der Anleitung von Frau Dr. A. Henschen durchgeführt.

Meiner "Doktormutter" möchte ich herzlich für die Betreuung der Arbeit und zahlreiche wertvolle Diskussionen danken.

Herrn Prof.Dr. G. Braunitzer danke ich für sein Entgegenkommen, diese Arbeit am Max-Planck-Institut durchführen zu können.

Für die Bereitschaft von Herrn Prof.Dr. H. Wagner, diese Arbeit im Fachbereich zu vertreten, danke ich ihm ganz besonders herzlich.

Herrn Prof.Dr. H. Fritz danke ich, daß er stets ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und mir durch sein herzliches Entgegenkommen über manche "Durststrecke" hinweghalf.

Meinen Dank auch allen Mitarbeitern der Abteilung für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, insbesondere Herrn Dr. Fritz Lottspeich, der nicht nur die automatischen Sequenzanalysen durchführte, sondern auch entscheidend dazu beitrug, daß mir meine Arbeit meistens Freude machte.

Frau Dr. Maria Kehl hat durch ihren Idealismus, ihr freundschaftliches Entgegenkommen und ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft mein Durchhaltevermögen sehr gestärkt.

Meiner Mitstreiterin Frau Astrid Reisbacher danke ich für ihre experimentelle Arbeit und ihr Engagement, das wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. Werner Müller-Esterl möchte ich ganz besonders herzlich danken für zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen. Seine Begeisterung an der Forschung hat mich oft angesteckt und zu neuen Experimenten inspiriert.

Herrn Dr. Ö. Schönberger aus der Forschungsabteilung von Prof. Hochstrasser danke ich für die Durchführung der Zuckeranalysen und Frau Maria Meier für das emsige und mühevollen Tippen vieler Seiten.

Zuallerletzt möchte ich meinem lieben Mann Klaus danken, der nicht nur ordentliche Tabellen gezeichnet hat, sondern auch immer durch viel Verständnis und Entgegenkommen positiv mitgewirkt hat.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. Z U S A M M E N F A S S U N G	1
A.1. Charakterisierung des Ausgangsmaterials	1
A.1.1. SDS-Gelelektrophorese	1
A.1.2. Aminosäurezusammensetzung	1
A.1.3. Zuckeranalyse	2
A.1.4. N-terminale Aminosäuresequenz	2
A.2. Untereinheiten des Eberakrosins	2
A.2.1. Trennung der zwei Polypeptidketten	2
A.3. Charakterisierung der schweren Kette	3
A.3.1. N-terminale Aminosäuresequenz	3
A.3.2. Fragmentierung der schweren Kette	3
A.3.3. Trennung der Bruchstücke	3
A.3.4. Sequenz	4
A.3.5. Homologie	4

	Seite
A.4. Charakterisierung der leichten Kette	5
A.4.1. Sequenz	5
A.4.2. Homologie	5
A.4.3. Aktivierungsmechanismus	5
 B. E I N L E I T U N G	 6
B.1. Historischer Überblick	6
B.2. Vorkommen von Akrosin	7
B.3. Lokalisation	8
B.4. Biologische Funktion	11
B.4.1. Zervixmukus-Penetration	11
B.4.2. Spermienmotilität	12
B.4.3. Induktion der Akrosomenreaktion	14
B.4.4. Zona pellucida Penetration	16
B.4.5. Dekondensation des Chromatingerüsts	18
B.5. Eberakrosin - bisheriger Kenntnisstand	19
B.5.1. Isolierung	19
B.5.2. Reinheitskriterien	20
B.5.3. Molekulare Parameter	20
B.5.3.1. Isoelektrischer Punkt	20
B.5.3.2. Wechselwirkung mit Amphiphilen	21

	Seite
B.5.4.	Enzymspezifität 21
B.5.5.	Katalysemechanismus 22
B.5.6.	Akrosininhibitoren 23
B.5.6.1.	Natürliche Antagonisten 23
B.5.6.2.	Synthetische Inhibitoren 25
B.5.7.	Immunologische Untersuchungen 26
B.5.8.	Regulation der Akrosinaktivität in vivo 27
B.5.8.1.	Die irreversible Proenzym-Enzym Aktivierung 28
B.5.8.2.	Die reversible Enzym-Inhibitor-Komplex- bildung 29
B.5.8.3.	Die Enzym-Phospholipid-Interaktion 29
B.6.	Aufgabenstellung und Strategie 30
C.	M A T E R I A L U N D M E T H O D E N 31
C.1.	Apparate 31
C.2.	Materialien 33
C.2.1.	Enzyme 33
C.2.2.	Materialien für die Säulenchromatographie 33
C.2.3.	Materialien für die Hochdruckflüssigkeits- chromatographie 33
C.2.4.	Materialien für die Elektrophoresen 34
C.2.5.	Materialien für die Fluorographie 34
C.2.6.	Materialien für die Sequenzanalyse 35

	Seite
C.2.6.1. Materialien für die automatische Sequenzanalyse	35
C.2.6.2. Materialien für die manuelle Sequenzanalyse	35
C.2.7. Materialien für die Aminosäureanalysen	35
C.2.8. Materialien für die Zuckeranalysen	35
C.2.9. Andere Materialien	36
C.3. Methoden	37
C.3.1. Modifikationsreaktionen	37
C.3.1.1. Mercaptolyse der Disulfidbrücken	37
C.3.1.2. Carboxymethylierung der freien SH-Gruppen	38
C.3.1.3. DFP-Inaktivierung	39
C.3.1.4. Radio-Markierung	39
C.3.2. Chromatographische Trennungen	39
C.3.3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie	40
C.3.3.1. Trennung der Ketten	40
C.3.3.2. Peptidtrennungen	41
C.3.3.3. Identifizierung der PTH-Aminosäuren	41
C.3.4. Elektrophoretische Methoden	42
C.3.4.1. Kontinuierliche SDS-Elektrophorese	42
C.3.4.2. Diskontinuierliche SDS-Elektrophorese	43
C.3.4.3. Autoradiographie	43
C.3.5. Sequenzanalyse	43
C.3.5.1. Durchführung der automatischen Sequenzanalyse	45
C.3.5.2. Durchführung der manuellen Sequenzanalyse	47

	Seite
C.3.6.	Aminosäureanalysen 48
C.3.7.	Zuckeranalysen 49
C.3.8.	Bestimmung des Proteingehaltes 49
C.3.9.	Methoden zur Spaltung von Peptidbindungen 50
C.3.9.1.	Chemische Spaltung 50
C.3.9.1.1.	Bromcyanspaltung 50
	Spaltung von S-carboxymethylierter schwerer Kette nach vorheriger Reduktion der Methionine 52
	Spaltung von S-carboxymethylierter leichter Kette nach vorheriger Reduktion der Methionine 52
C.3.9.2.	Enzymatische Spaltungen 53
C.3.9.2.1.	Limitierte Autoproteolyse 53
C.3.9.2.2.	Tryptische Spaltung 53
C.3.9.2.3.	Spaltung mit Staphylococcus aureus V8 Protease 54
C.3.9.2.4.	Digestion mit Thrombin, Kallikrein, Agkistrodon contortrix, Collagenase 55
C.3.9.2.5.	Digestion mit Pyroglutamat-Aminopeptidase 55
C.3.9.2.6.	Chymotryptische Spaltung 56
C.3.10.	Proteolytische Umwandlung von Akrosin MG 45 000 in Akrosin MG 40 000 56
D.	E R G E B N I S S E 57
D.1.	Charakterisierung des Ausgangsmaterials 57
D.1.1.	SDS-Gelelektrophorese 57
D.1.2.	Aminosäurezusammensetzung 57
D.1.3.	Zuckeranalyse 60

	Seite
D.1.4.	N-terminale Aminosäuresequenz des Ausgangsmaterials 60
D.2.	Untereinheiten des Akrosins 62
D.2.1.	Versuche zur Kettentrennung ohne vorherige Reduktion 62
D.2.1.1.	Gelfiltration an Sephadex G100 unter nicht-denaturierenden Bedingungen 62
D.2.1.2.	Gelfiltration an Sephadex G100 unter denaturierenden Bedingungen 64
D.2.1.3.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer "reversed-phase"-Säule 66
D.2.2.	Trennung der Ketten nach reduktiver Spaltung der Disulfidbrücken 68
D.2.2.1.	Reduktion und Carboxymethylierung 68
D.2.2.2.	Auftrennung durch Gelfiltration 68
D.2.2.2.1.	Charakterisierung der Komponenten 68
D.2.2.3.	Auftrennung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie 74
D.2.2.3.1.	Charakterisierung der erhaltenen Komponenten 74
D.2.3.	Zusammenfassung 77
D.3.	Charakterisierung der schweren Kette 77
D.3.1.	Aminosäurezusammensetzung 77
D.3.2.	Zuckeranalyse 79
D.3.3.	N-terminale Aminosäuresequenz 79
D.3.4.	Autoproteolyse 82
D.3.4.1.	Nachweis der Autolyse beim Akrosin 82

	Seite
D.3.4.2. N-terminale Charakterisierung der bei der Kettentrennung erhaltenen Nebenkomponten	85
D.3.4.3. Limitierte Autoproteolyse	87
D.3.4.3.1 Vorversuche im analytischen Maßstab	87
D.3.4.3.2. Präparative Durchführung	89
D.3.4.3.3. Isolierung der autoproteolytischen Fragmente	89
D.3.4.3.4. Charakterisierung der Pools der Gelchromatographie an Sephadex G100	89
D.3.4.3.5. Weitere Auftrennung des Peptidgemisches aus Pool A _{IV} und A _V	91
D.3.5. Bromcyanspaltung	91
D.3.5.1. Isolierung der Bromcyanfragmente	96
D.3.5.2. Charakterisierung der Pools der TSK-Chromatographie	97
D.3.5.3. Bemerkungen zur Bromcyanspaltung	100
D.3.6. Tryptische Spaltung	102
D.3.6.1. Vorversuche im analytischen Maßstab	102
D.3.6.2. Präparative Durchführung der tryptischen Spaltung	104
D.3.6.3. Charakterisierung der Pools der Gelchromatographie auf Sephadex G50 sf	104
D.3.7. Chymotryptische Spaltung	108
D.3.8. Spaltung mit Staphylococcus aureus V8 Protease	111
D.3.9. Digestion mit Thrombin, Kallikrein, Agkistrodon contortrix, Collagenase	114

	Seite
D.3.10. Weitere chemische Spaltungen	114
D.3.11. Bisher ermittelte Sequenz der schweren Kette	117
D.4. Die leichte Kette	119
D.4.1. Reindarstellung der leichten Kette	119
D.4.1.1. N-terminale Charakterisierung der durch HPLC neben der leichten Kette separierten Komponenten	119
D.4.2. Aminosäurezusammensetzung	122
D.4.3. Zuckeranalyse	122
D.4.4. N-terminale Aminosäuresequenz	124
D.4.5. Bestimmung des C-Terminus	124
D.4.6. Bestimmung des Kohlehydrat-tragenden Asparaginrestes	126
D.4.7. SDS-Gelelektrophorese	133
D.4.8. Isoelektrische Fokussierung	136
D.4.9. Untersuchungen auf freie Sulfhydrylgruppen	136
D.4.10. Zusammenfassung	139

	Seite
D.5.	Andere Akrosinformen 139
D.5.1.	SDS-Gelelektrophorese 140
D.5.2.	Aminosäurezusammensetzung 140
D.5.3.	Zuckeranalysen 140
D.5.4.	N-terminale Sequenzanalyse 144
D.5.5.	Autoproteolytische Umwandlung von α - Akrosin in β -Akrosin 145
D.5.6.	Isolierung des zusätzlichen Sequenzab- schnittes 145
D.5.6.1.	Charakterisierung der Pools der TSK-Chro- matographie 148
D.5.7.	Zusammenfassende Aussagen über die Lokali- sation des zusätzlichen Sequenzabschnittes der höhermolekularen Akrosinform 152
E.	D I S K U S S I O N 153
E.1.	Zur Sequenzaufklärung 153
E.2.	Über die Homologie des Akrosins mit anderen Serinproteinasen 155
E.2.1.	Allgemeine Bemerkungen 155
E.2.2.	Zuordnung zur schweren Kette 157

	Seite
E.3.	Zur aktiven, höhermolekularen Akrosin- form mit MG 45 000 174
E.4.	Über die Beziehung zwischen Struktur und Reaktivität 175
E.4.1.	Aktives Zentrum 175
E.4.2.	Primärspezifität 176
E.4.3.	Aktivierungsmechanismus 176
E.5.	Klinische Aspekte 181
F.	LITERATURVERZEICHNIS 183
	LEBENS LAUF

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abkürzungen für die Aminosäuren:

A	Alanin	Ala	Alanin
C	Cystein	Arg	Arginin
CC	S-Carboxymethylcystein	Asn	Asparagin
D	Asparaginsäure	Asp	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure	Cys	Cystein
F	Phenylalanin	Gln	Glutamin
G	Glycin	Glu	Glutaminsäure
H	Histidin	Gly	Glycin
I	Isoleucin	His	Histidin
K	Lysin	Ile	Isoleucin
L	Leucin	Leu	Leucin
M	Methionin	Lys	Lysin
N	Asparagin	Met	Methionin
P	Prolin	Phe	Phenylalanin
Q	Glutamin	Pro	Prolin
R	Arginin	SCM-Cys	S-Carboxymethylcystein
S	Serin	Ser	Serin
T	Threonin	HSer	Homoserin
V	Valin	Thr	Threonin
W	Tryptophan	Trp	Tryptophan
Y	Tyrosin	Tyr	Tyrosin
		Val	Valin

Abkürzungen für die Zucker:

NANA	Sialinsäure	Fuc	Fucose
GalNac	Galaktosamin	Gal	Galaktose
GlcNac	Glukosamin	Glc	Glukose
Man	Mannose		

AUFS	Absorption units full scale
BNPS-Skatol	2-(2-Nitrophenylsulfenyl)-3-methyl-3-bromindolenin
Bz-Arg-NHNp	N -Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid
Bz-Arg-OEt	N -Benzoyl-L-arginin-äthylester
DFP	Diisopropylfluorophosphat
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
MG	Molekulargewicht
HPLC	High pressure liquid chromatography
HUSI	Humanseminalplasma-Inhibitor
NBS	N-Bromsuccinimid
p-AB	p-Aminobenzamidin
p-NPGB	p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoat
PTH	3-Phenyl-2-thiohydantol
PIT	Phenylisothiocyanat
PTC	Phenylthiocarbamyl
Quadrol	N,N,N',N'-Tetrakis(2-hydroxypropyl)-äthylendiamin
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SSPI	Schweinespermaplasma-Inhibitor
TMED	N,N,N',N'-Tetramethylenäthylendiamin
TLCK	N -Tosyl-L-phenylalanin-chloromethylketon
Tos-Arg-OMe	N -Tosyl-L-arginin-methylester-Hydrochlorid
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TFA	Trifluoressigsäure

A. Z U S A M M E N F A S S U N G

Akrosin (EC 3.4.21.10), eine im Akrosom des Spermatozoons lokalisierte Serinendoproteinase, gilt als ein Schlüsselenzym der Fertilisation. Akrosin der Spezies "Schwein" wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Fritz isoliert und für die in dieser Arbeit beschriebenen proteinchemischen Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

A.1. Charakterisierung des Ausgangsmaterials

A.1.1. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese im Polyacrylamidgel zeigte vor und nach Reduktion der Proben ein zu 90% reines Protein mit einem Molekulargewicht von 40 000.

A.1.2. Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäurezusammensetzung wurde bestimmt. Bezogen auf ein Molekulargewicht von 40 000 läßt sich ein Gehalt von 340 Aminosäuren errechnen, wobei der außergewöhnlich hohe Gehalt an Prolin auffällt (11%).



A.1.3. Zuckeranalyse

An Aminoazuckern wurde nur Glucosamin gefunden, an Neutralzuckern sind Mannose, Fucose und Galactose vorhanden.

A.1.4. N-terminale Aminosäuresequenz

Ein N-terminaler Abbau von einigen Schritten zeigte zwei Aminosäuren in fast äquimolaren Mengen in jedem Schritt. Zusätzliche Sequenzen, die auf Verunreinigungen hindeuten würden, wurden nicht gefunden. Das Auftreten von zwei Aminoendgruppen läßt auf einen Aufbau des Eberakrosins aus zwei Polypeptidketten schließen.

A.2. Untereinheiten des Eberakrosins

A.2.1. Trennung der zwei Polypeptidketten

Eine Fraktionierung der beiden Ketten durch Gelchromatographie an Sephadex-Materialien unter denaturierenden Bedingungen wie Zusatz von Harnstoff oder Detergens zum Elutionspuffer war nicht möglich. Auch durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer "reversed phase" Säule mit organischen Lösungsmitteln erfolgte keine Trennung der Komponenten. Erst nach Spaltung der Schwefelbrücken mit Mercaptoäthanol und anschließender Carboxymethylierung ließen sich die zwei Polypeptidketten sowohl mittels einer Sephadex G100 Gelchromatographie als auch durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer "reversed phase" Säule separieren. Diese Fraktionierung der beiden Ketten nach vorausgegangener Reduktion läßt eine Assoziation über eine Disulfidbrücke vermuten.

Auf Grund des Molekulargewichtsunterschiedes werden die beiden Komponenten im Folgenden als schwere und leichte Kette bezeichnet.

A.3. Charakterisierung der schweren Kette

A.3.1. N-terminale Aminosäuresequenz

Die hochmolekulare Komponente wurde einem N-terminalen Abbau von 52 Schritten in einem automatisierten Sequenatorlauf unterzogen. Es zeigte sich in jedem Schritt nur eine Aminosäure.

A.3.2. Fragmentierung der schweren Kette

Da ein weiterer N-terminaler Abbau der gesamten Kette nicht möglich war, wurden durch chemische Spaltungen und enzymatische Hydrolysen Bruchstücke erhalten, die für den automatischen Edman-Abbau geeignet waren.

A.3.3. Trennung der Bruchstücke

Schwierigkeiten bei der Reinigung dieser Bruchstücke, die von deren Tendenz zur Unlöslichkeit, Aggregation, Haftung an hydrophoben Oberflächen und damit verbundenen schlechten Ausbeuten herrührten, wurden durch Chromatographie an Sephadexmaterialien in Ameisensäurer Harnstofflösung und durch Trennung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie in einem geeigneten Puffersystem überwunden.

A.3.4. Sequenz

Die Ergebnisse von Aminosäureanalyse und automatischem Edman-Abbau ermöglichten bisher die Aufklärung von ca. 85% der Primärstruktur der schweren Kette.

A.3.5. Homologie

Die schwere Kette zeigt alle Strukturmerkmale einer Serinproteinasen in der aktivierten Form. Die N-terminale Sequenz von 52 Schritten und zwei weitere C-terminale Bruchstücke ließen sich den bekannten Sequenzen anderer Serinproteinasen wie Chymotrypsin, Plasmin, Elastase, Thrombin, Trypsin, Streptomyces griseus-Trypsin und Kallikrein zuordnen. In bis nahezu 50% der Sequenzpositionen sind die Aminosäurereste dieser Sequenzabschnitte identisch. Die größte Ähnlichkeit wurde beim Vergleich mit Plasmin und Chymotrypsin gefunden.

Ein entscheidender Unterschied zu diesen homologen Serinproteinasen besteht in dem um 50% höheren Molekulargewicht der schweren Kette. Dies läßt auf zusätzliche Peptidbereiche im Akrosinmolekül schließen, die für die besonderen Eigenschaften der Serinproteinasen Akrosin verantwortlich sind.

A.4. Charakterisierung der leichten Kette

A.4.1. Sequenz

Beim N-terminalen Abbau ergab sich für die leichte Kette eine Sequenz von 23 Aminosäuren, was im Einklang mit der Aminosäureanalyse ist. Die Aminosäureanalyse zeigte außerdem, daß die Hauptmenge des Gesamtzuckers des Akrosinmoleküls N-glykosidisch gebunden in der leichten Kette enthalten ist.

A.4.2. Homologie

Eine mögliche Homologie der leichten Kette besteht mit den Proenzymsequenzen von Thrombin, Gewebsplasminogenaktivator, Plasmin, Chymotrypsin, den Blutgerinnungsfaktoren Faktor IX und X und der bakteriellen Protease C.

A.4.3. Aktivierungsmechanismus

Diese Homologie läßt einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus wie bei den in A.4.2. erwähnten Enzymen diskutieren. Eventuell erfolgt die Aktivierung durch Autolyse, wobei eine ursprünglich vorhandene "Prosequenz" mehr und mehr abgebaut wird und die leichte Kette als letzter Rest nach der Aktivierung über eine Schwefelbrücke an den aktiven Serinproteinaseteil gebunden bleibt.

B. EINLEITUNG

B.1. Historischer Überblick

Das Verständnis der biologischen Vorgänge von Fertilisation und Reproduktion übte schon immer eine starke Faszination auf Naturwissenschaft und Naturphilosophie aus. Der Befruchtungsvorgang dient jeder Spezies zur Arterhaltung und zur Verbreitung der genetischen Mannigfaltigkeit. Schon im Altertum wurden Spekulationen über das Wunder "Fortpflanzung" angestellt; eine der umfassendsten Darstellungen ist uns von Aristoteles (384 - 322 v. Chr.) in seinem Opus "de generatione animalium" erhalten, in dem er den Samen als Aktivator eines komplizierten Stoffwechselsystems im Ovum darstellt. Seine Ideen wirkten als Grundlage bis in die neuzeitliche Embryologie fort. Biochemie und Biologie haben dann in neuerer Zeit durch Aufklärung der molekularen Vorgänge im Fertilisations- und Reproduktionsgeschehen neue Perspektiven geschaffen. Dabei trat im letzten Jahrzehnt besonders die Untersuchung der enzymatischen Vorgänge, die sich beim Befruchtungsvorgang abspielen, in den Vordergrund des Interesses.

Erste Hinweise auf die Existenz eines proteolytischen Enzyms im Spermium, das einen auflösenden Effekt auf die Eihüllen besitzt, wurden schon in den frühen dreißiger Jahren von Yamane (1930, 1935) gegeben. Seine Ideen und Befunde blieben zunächst weitgehend unbeachtet. Erst ca. zwanzig Jahre später folgten die nächsten Berichte über Proteinasen aus Spermien verschiedener Spezies, als Buruiana (1956) und später Waldschmidt et al. (1966) trypsin-

ähnliche Wirkungen von Spermien und Spermienextrakten beschrieben. Etwa zur gleichen Zeit konnten Hartree und Srivastava (1965) durch selektives Abtrennen der Spermienkopfkappen (Akrosomen) zeigen, daß die in Spermien gefundene Proteinase akrosomaler Herkunft ist. Diese Ergebnisse wurden von Stambaugh und Buckley (1968, 1969) bestätigt und dahingehend erweitert, daß diese akrosomale Proteinase, später Akrosin genannt, in der Lage ist, die Zona pellucida der Eihüllen aufzulösen. Damit war erstmals eine potentielle biologische Funktion von Akrosin postuliert worden.

Erste Erfolge bei der Reinigung und Charakterisierung dieses tryptinähnlichen Enzyms aus Spermatozoen gelangen wenig später Zaneveld et al. (1970, 1971) sowie Fritz et al. (1972). Zaneveld konnte dabei nachweisen, daß es sich um eine einzigartige, bisher unbekannte Proteinase handelt und schlug den Namen "Akrosin" vor. Diese Bezeichnung wurde 1972 offiziell von der "Commission in Biochemical Nomenclature" als Enzym Nr. 3.4.21.10 übernommen.

B.2. Vorkommen von Akrosin

Akrosin ist in verschiedenen Vertebratenklassen wie Säugetieren, Amphibien und Vögeln (Penn und Gledhill, 1972; Palmer und Howarth, 1973; Elison, 1974; Ho und Meizel, 1976) sowie in den phylogenetisch niederstehenden Invertebratenklassen der Seescheiden (Hoshi et al., 1981) und Seeigel (Levine et al., 1978; Levine und Walsh, 1980) nachgewiesen worden.

Ganz allgemein kann man davon ausgehen, daß Akrosin ubiquitär zu finden ist, wo eine Befruchtung durch das Zusammenwirken von Samen und Ei stattfindet.

B.3. Lokalisation im Akrosom

Akrosin wurde mittels verschiedener immunologischer Methoden im Akrosom der Spermienzelle nachgewiesen.

Das Akrosom ist ein kappenähnliches Gebilde im anterioren Teil des Spermienkopfes mit lysosomaler Enzymausstattung. Es wird im Laufe der Spermiogenese aus Teilen des Golgi-Apparates gebildet. In Abb.1 ist der Kopfteil eines Spermiums dargestellt.

Das Akrosom wird durch eine innere und eine äußere akrosomale Membran gebildet, die im Bereich des sog. äquatorialen Segments miteinander verschmelzen und den akrosomalen Raum mit einem Volumen von ca. $1,5 \mu\text{m}^3$ ($= 1,5 \times 10^{-15} \text{ l}$) einschließen. Darüber liegt die das ganze Spermium umhüllende Plasmamembran. Subzelluläre Fraktionierungsstudien an Spermien (Stambaugh und Buckley, 1969) sowie Untersuchungen zur gelatinolytischen Aktivität der Spermatozoen (Gaddum und Blandau, 1970) gaben erste Hinweise auf die Lokalisation des Akrosins im Bereich der Akrosomenkappe. Schirren et al. (1971) sowie Schill und Wolff (1974) konnten zeigen, daß aufgrund einer genetischen Aberration entstehende Spermatozoen ohne Akrosom kein Akrosin besitzen. Die sog. Globozoospermie geht mit Infertilität einher, was auf eine entscheidende biologische Rolle von Akrosom und Akrosin bei der Fertilisation hinweist.

Brown und Hartree (1974) stellten fest, daß an der inneren akrosomalen Membran von "nackten" Spermatozoen, d.h. nach künstlicher Entfernung von Plasma- und äußerer akrosomaler Membran, noch ca. 70% der Akrosinaktivität erhalten ist. Histochemische Untersuchungen mit Silbercaseinat als Substrat (Stambaugh et al., 1975) und mit fluoreszenzmarkierten Proteinaseinhibitoren (Stambaugh und Buckley, 1972) lieferten weitere Hinweise auf die Lokalisation von Akrosin im Akrosom.

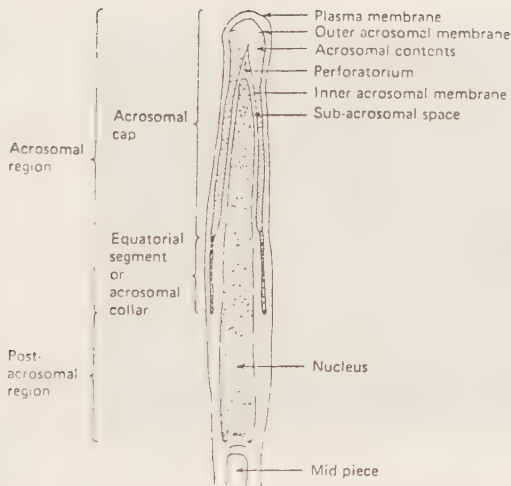


Abb.1 Schematische Darstellung des Spermienkopfes nach Morton (1976)

Acrosomal region (akrosomale Region);
Postacrosomal region (postakrosomale Region);
Acrosomal cap (Akrosomenkappe);
Equatorial segment or acrosomal collar (Äquatorialsegment oder Akrosomenhals);
Plasma membrane (Plasmamembran);
outer acrosomal membrane (äußere akrosomale Membran);
Acrosomal contents (akrosomaler Inhalt);
inner acrosomal membran (innere akrosomale Membran);
Sub-acrosomal space (subakrosomaler Raum);
Nucleus (Kern); Mid piece (Zwischenstück);



Abb.2 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis der akrosomalen Lokalisation des Akrosins bei ejakulierten Eberspermatozoen

Durch die Verwendung spezifischer Antikörper gegen Eberakrosin konnte mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenztechnik die akrosomale Proteinase im Bereich der gesamten Akrosomenkappe bei intakten und "nackten" Spermatozoen lokalisiert werden (s. Abb.2) (Schill et al., 1975). Auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse geht man heute allgemein von der Annahme aus, daß Akrosin im Bereich des Akrosoms vorkommt, wenngleich die Ultralokalisation derzeit noch strittig ist; verschiedene Hinweise deuten auf eine Assoziation der Proteinase mit der inneren akrosomalen Membran hin, jedoch erschweren experimentelle Artefakte (laterale und transversale Diffusion durch Fixation) eine exakte Lokalisation.

Die intra-akrosomale Konzentration von Eberakrosin liegt bei 3 mM, was $2,5 \times 10^{-18}$ Mol Akrosin oder 240 000 Molekülen pro Spermatozoon entspricht. (Zum Vergleich: Die Hämoglobinkonzentration in Erythrozyten liegt bei 5,1 mM).

B.4. Biologische Funktion

Akrosin gilt als proteolytisches "Schlüsselenzym" in verschiedenen Stadien der Gametenfusion. Bezüglich der biologischen Funktion des Akrosins werden heute vor allem folgende Wirkungsmechanismen postuliert:

1. Transport der Spermien durch den Zervixmukus
2. Stimulation der Spermienmotilität und damit der Migration im weiblichen Genitaltrakt
3. Induktion der Akrosomenreaktion
4. Digestion eines Weges für das Spermium durch die Zona pellucida
5. Dekondensation des Chromatingerüsts

B.4.1. Zervixmukus-Penetration

Die Spermien wandern nach der Deposition in der Ampulla vaginæ durch den weiblichen Genitaltrakt (Uterus, Tuben), bis sie im pars ampullaris des Eileiters eine Oocyte erreichen. Bei der Passage der Spermatozoen durch den Zervixmukus postulieren Schumacher und Zaneveld (1974) eine adjuvante Funktion von Akrosin durch Verringerung der Viskosität des Zervixschleimes durch Depolymerisation der Sialoglykoproteine des Zervixmukus. Die Autoren konnten zeigen, daß durch hohe Konzentrationen von Seruminhibitoren

(α_1 -Antitrypsin, Inter- α -Trypsininhibitor u.a.), die Akrosin effektiv hemmen, eine enzymatische Hydrolyse des Zervixmukus in vitro signifikant erniedrigt wird. Diese Hypothese erhält weitere Unterstützung durch den Befund, daß die Konzentration dieser in vivo im Zervixmukus vorkommenden Inhibitoren zum Zeitpunkt der Ovulation, also im konzeptionsfähigen Zeitraum des Zyklus, am geringsten ist.

Jedoch widersprechen Ergebnisse von Beyler und Zaneveld (1979) dieser Annahme, da diese Autoren bei Verwendung niedermolekularer synthetischer Akrosininhibitoren (TLCK, p-NPGB, p-AB) keine verschlechterte Mukuspenetration der Spermien beobachten konnten. Da Akrosin nur dann externe Wirkung entfaltet, wenn das Akrosom nicht mehr intakt ist und Akrosin aus seinem biologischen Kompartiment herausdiffundieren kann, wäre ein Modell von "Pionierspermatozoen" denkbar, die durch Liberation von Akrosin an der enzymatischen Hydrolyse des Zervixmukus mitwirken und somit als Wegbereiter die Penetration nachfolgender Spermatozoen begünstigen (Blandau, 1973).

B.4.2. Spermienmotilität

Die Migration der Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt setzt neben günstigen physikalisch-chemischen Mukusverhältnissen auch eine propulsive Eigenbeweglichkeit der Spermatozoen voraus.

Palm et al. (1976) konnten zeigen, daß Akrosin eine potente Kininogenase ist, die aus Kininogen pharmakologisch aktive Kinine freisetzt, ähnlich wie Trypsin und Schweinepankreas-Kallikrein.

Das Substrat Kininogen, aus dem Kinine freigesetzt werden, ist im Spermaplasma wie im Zervixmukus und wahrscheinlich auch im Uterus- und Tubensekret durch Plasma-Diapedese vorhanden. Es wäre also denkbar, daß Akrosin, welches aus degenerierenden

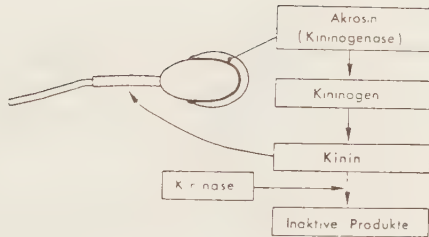


Abb.3 Schema zur hypothetischen Funktion von Akrosin auf die Spermatozoenmotilität in utero

Spermatozoen im weiblichen Genitaltrakt freigesetzt wird, durch die Liberation von Kininen die Spermatozoen-Motilität in utero stimuliert (s. Abb.3), sowie durch einen zusätzlichen Kinineffekt auf die glatte Muskulatur des Uterus den Spermatozoentransport begünstigt (Fritz et al., 1973).

Das Studium der Wirkung der einzelnen Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Spermatozoen-Motilität (Schill und Haberland, 1975) ergab, daß Kininogenasen (z.B. Pankreaskallikrein) bzw. Kinine einen stimulierenden Effekt auf die Spermatozoen-Motilität haben und daß dieser Effekt durch Zugabe einer Kininase (z.B. Carboxypeptidase B) supprimiert wird. Die Freisetzung von Kininen durch Akrosin aus desintegrierten Spermien (Wegbereitern) könnte also einen stimulierenden Effekt auf die nachfolgenden Spermien vermitteln.

B.4.3. Induktion der Akrosomenreaktion

Bevor im Folgenden dieser Wirkungskomplex näher beschrieben wird, soll zum besseren Verständnis kurz auf die Ultrastruktur des Spermiums im jeweiligen Stadium des Befruchtungsvorganges eingegangen werden (s. Abb.4 und 5).

Ejakulierte Spermien besitzen noch nicht die Fähigkeit zur Befruchtung. Sie erlangen diese erst im weiblichen Genitaltrakt, indem sie spezifische Reifungsprozesse durchlaufen. Zunächst erfolgt in Vagina, Zervix und Uterus eine Abdissoziation von Seminalplasmainhibitoren, die an der Spermienoberfläche adsorbiert sind und damit eine "Demaskierung" akrosomaler Enzyme (Zaneveld et al., 1975). Gleichzeitig bzw. im Anschluß daran erfolgt in Uterus- und Eileiterlumen ein biochemischer Reifungsprozeß ohne offensichtliche morphologische Veränderungen an den Spermien, den Chang (1951) und Austin (1951, 1970) unabhängig voneinander beschrieben und "Kapazitation" genannt haben (Abb.4). Dieser reversible Prozeß der Kapazitation des Spermiums ist gekennzeichnet durch den Verlust Oberflächen-assoziiierter Proteine; die damit verbundene Änderung der Oberflächenladung führt zu einer Labilisierung der Plasmamembran.

Erst in unmittelbarem Kontakt mit der Eizelle kommt es zu einem morphologisch fassbaren Strukturwandel des kapazitierten Spermiums, der sog. Akrosomen-Reaktion (Abb.5). Diese geht mit einer progressiven Fusion und Vesikulation der Spermienplasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran einher. Durch den Verlust der äußeren akrosomalen Grenzmembran entweicht der akrosomale Inhalt mit den für die Penetration notwendigen Enzymen (Corona-penetrating enzyme, Hyaluronidase und Akrosin). Meizel und Lui (1976) postulieren, daß Akrosin an der Auslösung der Akrosomenreaktion mitbeteiligt ist, da niedermolekulare Akrosininhibitoren, die in die akrosomalen Membranen eindringen und somit eine intraakrosomale Hemmung von Akrosin hervorrufen können, die Akrosomenreaktion hemmen.

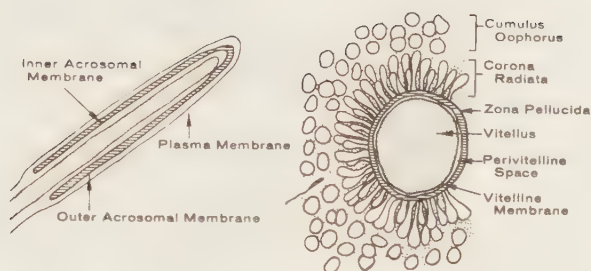


Abb.4 Status des kapazitierten Spermiums (links) und Penetration des cumulus oophorus (rechts) nach McRorie et al. (1974)

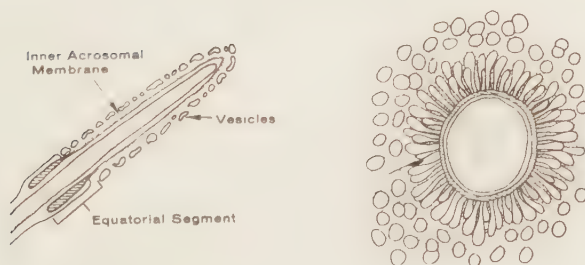


Abb.5 Akrosomenreaktion des Spermiums (links) und Penetration der corona radiata (rechts) nach McRorie et al. (1974)

Eine von Shams-Borhan und Harrison (1981) durchgeführte elektronenmikroskopische Studie zeigt aber, daß die Vesikulation der äußeren Membran durch Akrosininhibitoren nicht beeinflußt wird, wohl aber die Dispersion der akrosomalen Matrix.

Einer Beteiligung von Akrosin an der Akrosomenreaktion wird auch von Green (1978) widersprochen, der elektronenmikroskopisch einen normalen Ablauf der Akrosomenreaktion auch in Gegenwart von Akrosininhibitoren beobachtete; jedoch wurde die Dispersion des akrosomalen Inhalts verhindert.

Auf Grund dieser Gegenargumente sollte eine Beteiligung von Akrosin an der Induktion der Akrosomenreaktion kritisch betrachtet werden.

B.4.4. Zona-pellucida Penetration

Mit Hilfe der während der Akrosomenreaktion aus dem Spermienkopf austretenden Enzyme vermag nun das Spermium die verschiedenen Eihüllen zu durchdringen (Abb.6). Während Hyaluronidase die hyaluronsäurehaltige Kittsubstanz zwischen den Cumulus-oophorus-Zellen hydrolysiert (Metz, 1972), wird für den Durchtritt des Spermiums durch die Interzellulärsubstanz der Corona radiata das bisher nur wenig charakterisierte corona-penetrating enzyme (CPE) verantwortlich gemacht (Zaneveld und Williams, 1970).

Die zentral liegende zona pellucida stellt nun als kompakte Glykoproteinmembran die letzte mechanische Barriere für die Spermatozoen dar. Allgemein geht man heute davon aus, daß Akrosin das kompetente Spermienenzym für die Proteolyse der zona pellucida und damit zur digestiven Bahnung des Spermienweges darstellt. Akrosin nimmt somit eine permissive Rolle auf einer frühen Stufe der Gametenfusion wahr (Srivastava et al., 1965; Stambaugh und Buckley, 1969).

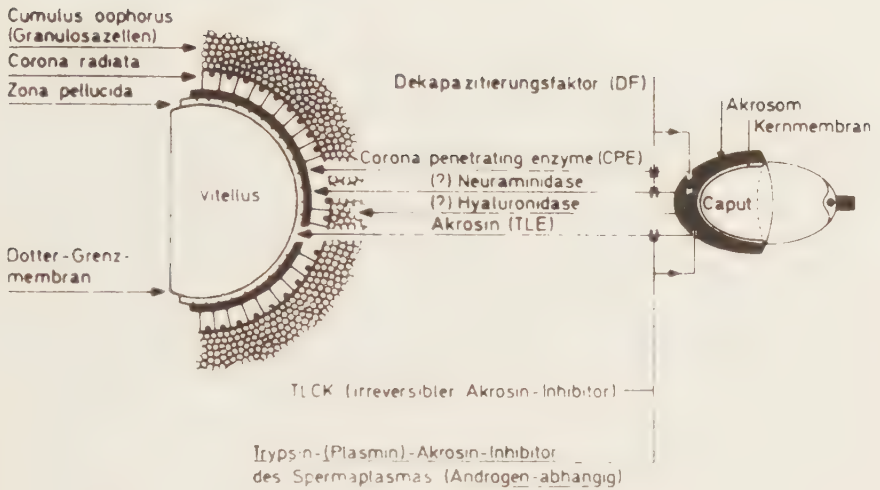


Abb.6 Schematische Darstellung von Eizelle und Spermium mit den Enzymen des Akrosoms sowie deren Inhibitoren nach Fritz et al. (1971)

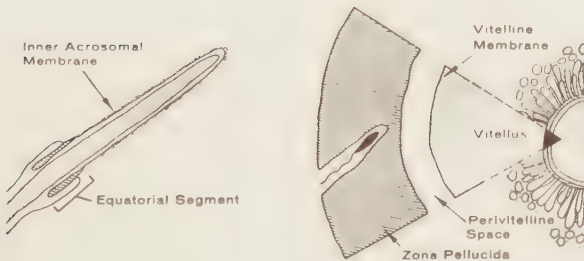


Abb.7 Spermium nach der Akrosomenreaktion (links) und Penetration der zona pellucida (rechts) nach McRorie et al. (1974)

Im Stadium der zona pellucida Penetration ist die Akrosomenreaktion bereits vollzogen und die innere akrosomale Membran fungiert als Grenzmembran (Abb.7). Die mutmaßliche Lokalisation des Akrosins an der inneren Akrosomenmembran und seine proteolytischen Eigenschaften sprechen für die biologische Funktion der zona-Lysis durch Akrosin. Erhärtet wird dieses Postulat durch die Beobachtung verschiedener Autoren, daß durch natürliche und synthetische Akrosininhibitoren die Fertilisationsraten in vitro und in vivo signifikant vermindert werden (Stambaugh et al., 1969; Zaneveld et al., 1970, 1971; Suominen et al., 1973).

Stambaugh und Smith (1976) konnten zeigen, daß cytochemische Reaktionsprodukte in den Penetrationskanälen auf die Proteinase Akrosin hinweisen. Obgleich sich einige Autoren auch kritisch mit dieser Hypothese auseinandersetzen (Bedford 1978; Gwatkin 1977) wird die biologische Funktion des Akrosins als lytisches Agens der zona pellucida heute allgemein akzeptiert.

B.4.5. Dekondensation des Chromatingerüsts

Eine weitere Hypothese hinsichtlich der biologischen Funktion von Akrosin betrifft die Auflösung des chromosomalen Chromatingerüsts.

Nach der Inkorporation des Spermiums in das Cytoplasma des Ovums führen weitere enzymatische Prozesse zur Dekondensation der Chromosomen durch gezielten Abbau der Histone. Marushiga et al. (1975, 1978) konnten eine trypsinähnliche Proteinase aus isoliertem Bullenchromatin isolieren, die in vitro fähig ist, eine Dekondensation der Histone auszulösen. Eine nähere Charakterisierung der enzymatischen Eigenschaften und der elektrophoretischen Mobilität ließen den Schluß zu, daß es sich bei der Dekondensationsprotease um Akrosin handelt.

Nach Beobachtungen von Zirkin und Chang (1977) hemmen Inhibitoren wie z.B. Sojabohnen-Trypsininhibitor die Proteolyse der Histone in vitro.

Eine Beteiligung von Akrosin an der Dekondensation des Chromatingerüsts wird von Young (1979) ausgeschlossen, da das an der inneren akrosomalen Membran lokalisierte Akrosin nach der Spermium-Ovum-Fusion in einem Vesikel eingeschlossen und somit von einem direkten Kontakt mit dem Chromatin ausgeschlossen ist.

Die Hypothese der Beteiligung von Akrosin an der Dekondensation des Chromatingerüsts wird heute weitgehend verlassen.

B.5. Eberakrosin - bisheriger Kenntnisstand

Im Folgenden wird unter Akrosin stets Eberakrosin verstanden, da die biochemische und enzymologische Charakterisierung bei Akrosin dieser Spezies am weitesten fortgeschritten ist und Ejakulate dieser Spezies auf Grund großer Ejakulationsvolumina und hoher Spermatozoendichte eine Isolierung des Enzyms im präparativen Maßstab zulassen.

Somit erfolgte auch die Bereitstellung von Ausgangsmaterial für die Studien an der Primärstruktur aus Ejakulaten der Spezies "Schwein".

B.5.1. Isolierung

Ein von Müller-Esterl et al. (1980) beschriebenes 5-Stufen-Verfahren ermöglicht eine Reindarstellung des aktiven Enzyms im präparativen Maßstab: Die essigsäuren Extrakte gewaschener und schock-

gefrorener Eberspermien werden über eine Chromatographiesäule an Sephadex G100 vorgereinigt. Dabei werden die in den Spermienextrakten vorhandenen seminalen und akrosomalen Inhibitoren abgetrennt. Anschließend wird Akrosin auf Grund seiner hydrophoben Eigenschaften in einer hydrophoben Interaktionschromatographie an Phenylsepharose gebunden und durch nicht-ionische Detergentien wieder eluiert. Eine anschließende Kationenaustauschchromatographie an SP-Sephadex G50 bei pH 3,6 erfolgt in Gegenwart von 0,1% Triton X-100, ebenso wie die nachfolgende biospezifische Affinitätschromatographie an immobilisiertem Benzamidin als Ligand.

Schließlich werden Detergentien und Salze an Merckogel PGM 2000 entfernt und das somit reine Enzym lyophilisiert. Dieses Verfahren führt zu einer 160-fachen Anreicherung des Enzyms mit einer Gesamtausbeute von 40%.

B.5.2. Reinheitskriterien

Das nach B.5.1. isolierte Enzym erwies sich als homogen in der Disk-Elektrophorese bei pH 5,0 (Müller-Esterl et al., 1980). In der SDS-Gradientengelelektrophorese nach Lämmli (1970) unter reduzierenden Bedingungen zeigten sich neben der Hauptbande mit MW 40 000 schwache weitere Banden mit niedrigerem Molekulargewicht, die als autoproteolytische Abbauprodukte interpretiert wurden (s. D.3.4.).

B.5.3. Molekulare Parameter

B.5.3.1. Isoelektrischer Punkt

Der isoelektrische Punkt dieser Präparation liegt bei pH 10,5 (Müller-Esterl et al., 1980).

B.5.3.2. Wechselwirkung mit Amphiphilen

Müller-Esterl und Fritz (1980) stellten fest, daß die enzymatische (amidolytische) Aktivität durch nicht-ionische Detergentien bis zu 250% stimuliert und durch Phospholipide bis zu 100% inhibiert wird. Weiterhin bindet Akrosin reversibel an hydrophobe Oberflächen (Phenyl-Sepharose bzw. Plastikflächen). Die Autoren schlossen daraus, daß Akrosin hydrophobe Bindungsstellen für Amphiphile besitzt. Diese Interpretation wird gestützt durch die ausgeprägte Tendenz von Akrosin zur Selbstaggregation in detergentienfreien, sauren Lösungen (Müller et al., 1980). Von den dabei auftretenden Oligomeren (Dimere bis Heptamere) besitzt nur das Monomere enzymatische Aktivität gegenüber niedermolekularen Substraten.

Da Akrosin unter recht milden Bedingungen aus Spermien extrahierbar ist und bei der Extraktion keine Membranteile gefunden werden, wurde von Brown und Hartree (1976) bzw. Müller-Esterl et al. (1980) die Hypothese aufgestellt, daß Akrosin ein peripheres Protein der inneren akrosomalen Membran darstellt, das über diskrete hydrophobe Bindungsstellen verankert ist.

B.5.4. Enzymspezifität

Akrosin ist eine Endoproteinase aus der Klasse der Serinproteinasen. Die Spaltungsspezifität gegenüber natürlichen und synthetischen Substraten ist analog wie bei Trypsin streng auf Arginyl- und Lysyl-Bindungen limitiert (Schlessler et al., 1975).

Akrosin spaltet makromolekulare Substrate wie Azocasein, denaturiertes Hämoglobin, Gelatine, Fibrinogen, Ribonuklease und Insulin (nach Morton, 1976).

Akrosin spaltet synthetische Substrate wie Bz-Arg-NHNp, Bz-Arg-OEt oder Tos-Arg-OMe. Allgemein kann man sagen, daß Argininamide

oder -ester als Substrate bevorzugt erkannt werden.

Das pH-Optimum für die Spaltung von Bz-Arg-OEt als Substrat liegt zwischen pH 8 und 8,5 und für die Bz-Arg-NHNp-Spaltung zwischen pH 7,5 und 7,8 (Schleuning und Fritz, 1974).

Zur Charakterisierung der nach B.5.1. isolierten Eberakrosinpräparation wurde die amidolytische Aktivität mit Bz-Arg-NHNp als chromogenem Substrat bestimmt und die Extinktionsänderung photometrisch verfolgt (Schleuning und Fritz, 1974).

Die spezifische Aktivität hochgereinigter Präparate liegt bei 37 U/mg, gemessen mit Bz-Arg-NHNp als Substrat (Müller-Esterl et al., 1980).

B.5.5. Katalysemechanismus

Aus der irreversiblen Hemmung von Akrosin durch Diisopropylfluorophosphat (DFP) geht hervor, daß im aktiven Zentrum des Enzyms die Aminosäure Serin vorhanden ist; die spezifische Inaktivierung erfolgt durch Bildung eines diisopropylphosphorylierten Enzyms im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 (Hartley, 1960).

Die Hemmbarkeit durch TLCK via Alkylierung eines Histidinrestes deutet auf die Existenz eines für die Aktivität essentiellen Histidinrestes hin, was für trypsinähnliche Proteinasen typisch ist (Shaw et al., 1965).

Der Vergleich der Reaktivitäten von Akrosin und Trypsin mit Peptidderivaten des L-Arginyl-chlor-methans mit unterschiedlichen Aminosäureresten in den Positionen P_2 und P_3 deutet darauf hin, daß die sekundären Substratbindungsstellen beider Proteasen sehr ähnlich sind. Ebenfalls synthetisierte Chlormethane mit Homoarginin, Lysin und D-Arginin in Position P_1 zeigten bei der Inaktivierung sowohl von Akrosin als auch von Trypsin eine wesentlich geringere Hemmwirkung als die entsprechenden L-Arginyl-chlormethane (Kettner et al., 1978).

Keine Hemmung wurde mit TPCK erzielt, was auf einen Unterschied zu Chymotrypsin in der primären Substratspezifität hinweist.

Man nimmt heute allgemein an, daß Akrosin der Klasse der Serin-endoproteinasen angehört.

B.5.6. Akrosininhibitoren

Die Inhibitoren, die Eberakrosin gezielt inaktivieren, können entsprechend ihrer Herkunft in 2 Typen eingeteilt werden:

- natürliche Antagonisten, die selbst Glykoproteine sind und z.B. im Genitaltrakt vorkommen
- synthetische Inhibitoren, die ein niedrigeres Molekulargewicht haben ($< 1\ 000$).

B.5.6.1. Natürliche Antagonisten

Zwei natürlich vorkommende Akrosininhibitoren aus Seminalplasma bzw. Spermatozoen der Spezies Schwein sind bisher isoliert und charakterisiert worden.

Der von Fink et al. (1971) aus Spermaplasma isolierte säurestabile Schweinespermaplasma-Inhibitor SSPI wurde hinsichtlich biochemischer Eigenschaften und biologischer Funktion untersucht (Übersicht Fritz et al., 1975). Es handelt sich bei SSPI um ein Glykoprotein mit einem MW von 11 000; die Struktur wurde von Tschesche et al. (1974) aufgeklärt. Sie zeigt klare Homologien zu denen der sekretorischen Pankreas-Trypsininhibitoren vom Kazal-Typ. Im reaktiven Zentrum des Inhibitormoleküls findet sich die Aminosäure Arginin. Der SSPI bewirkt eine starke Hemmung von Akrosin, Trypsin und Plasmin. Von Schill et al. (1975) durchgeführte immunfluoreszenzoptische Untersuchungen am Eber mittels Verwendung spezifischer Antikörper gegen SSPI zeigten, daß der Inhibitor im sekretorischen Epithel der Bläschendrüsen gebildet und post ejaculationem an Spermien gebunden wird; er konnte jedoch

nicht bei testikulären bzw. epididymalen Spermien detektiert werden. Weiterhin konnte durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, daß der Großteil der Spermatozoen in utero keine Fluoreszenz mehr aufweist. Dies spricht für die Richtigkeit des von Zaneveld et al. (1969) entwickelten Konzeptes, daß die Akrosin-inhibitoren während der Ejakulation an die äußeren Akrosomenmembranen gebunden und während der Uteruspassage im Rahmen der Kapazitation wieder desorbiert werden, wodurch die Spermatozoen ihre Befruchtungsfähigkeit erlangen.

Die biologische Rolle des in hohen Konzentrationen in der Epididymalflüssigkeit und im Spermaplasma vorkommenden Spermaplasma-Inhibitors SSPI muß auf Grund der Verteilung im Genitaltrakt in einer Schutzfunktion gesehen werden: Sofortige Inaktivierung unkontrollierter proteolytischer Aktivität von Akrosin zu einem für den Organismus ungünstigen Zeitpunkt oder am falschen Ort.

Erst kürzlich wurde ein zweiter, spezifischer Akrosininhibitor gefunden, der unmittelbar mit dem Eberspermium assoziiert ist (Tschesche et al., 1982). Auch dieser Inhibitor ist ein Glykoprotein mit MW 7 500. Im reaktiven Zentrum befindet sich ebenfalls die Aminosäure Arginin. Trypsin und Plasmin werden von diesem Inhibitor bemerkenswerterweise nicht gehemmt. Es handelt sich bei diesem Inhibitor um das erste Beispiel eines Akrosin-selektiven Inhibitors, der das enzymatisch nahe verwandte Trypsin nicht hemmt.

Die physiologische Bedeutung dieses Inhibitors ist bisher nicht bekannt; da er im Spermium in einem äquimolaren Verhältnis zu Akrosin vorzukommen scheint, könnte seine natürliche Funktion in einer Regulation der Aktivierung liegen (s. B.5.7.).

Neben den beschriebenen niedermolekularen Akrosininhibitoren existieren im Spermaplasma und in den weiblichen Genitalsekreten geringe Konzentrationen an hochmolekularen säurelabilen Proteinasen-inhibitoren (α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin), von denen α_1 -Antitrypsin für die akrosomale Proteinase einen Progressivin-

hibitor darstellt. Diesen hochmolekularen Akrosininhibitoren scheint jedoch beim Fortpflanzungsvorgang keine physiologische Bedeutung zuzukommen (Zaneveld et al., 1975).

Steven et al. (1982) beobachteten, daß zweiwertige Metallionen wie Zn^{++} , Cu^{++} , Hg^{++} , Co^{++} , Cd^{++} effiziente reversible Akrosininhibitoren darstellen.

Die hohe Zinkkonzentration von 0,4 - 6,5 mM (Eliasson 1971) ist ausreichend, um die gesamte spermiengebundene Akrosinaktivität zu inhibieren.

Motile Spermatozoen verlassen das hohe umgebende Zinkmilieu des Seminalplasmas, wenn sie im Zervixmukus migrieren, der eine Zinkkonzentration von 15 μM aufweist (Hagenfeldt 1972). Dieser Abfall der Zinkkonzentration im weiblichen Genitaltrakt soll die Reaktivierung von Akrosin am physiologischen Ort der Wirkung, nämlich der zona pellucida Penetration des Ovums, bewirken.

Aus menschlichem Spermaplasma wurden ebenfalls zwei niedermolekulare, säurestabile Inhibitoren isoliert (Fritz et al., 1975), ein Trypsin-Chymotrypsininhibitor (HUSI-I), der Akrosin nicht hemmt, und ein Trypsin-Akrosininhibitor (HUSI-II), der Chymotrypsin nicht hemmt. Im reaktiven Zentrum von HUSI-II findet sich wie beim SSPI die Aminosäure Arginin.

B.5.6.2. Synthetische Inhibitoren

Akrosin wird von nahezu allen synthetischen Trypsininhibitoren gehemmt, so etwa von Diisopropylfluorophosphat, Chloromethylketonen und Benzamidinen (Multamäki und Niemi, 1972; Polakoski et al., 1971). Die Zugänglichkeit (d.h. Hemmbarkeit) des Akrosins innerhalb des Akrosoms wurde für eine Vielzahl natürlich vorkommender und synthetischer Akrosininhibitoren mit Hilfe des Gelatinolysetests, der von Wendt et al. (1975) speziell dafür

adaptiert wurde, untersucht. Dabei zeigte sich, daß nur wenige synthetische Inhibitoren mit spezifischen Struktureigenschaften die akrosomalen Membranen von intakten Eberspermien zu penetrieren und damit Akrosin zu hemmen vermögen.

Die Entwicklung neuer niedermolekularer Inhibitoren für die in vivo Akrosinhemmung ist von besonderem Interesse sowohl für die detaillierte Klärung der molekularen Wirkung von Akrosin als auch für die Verwendbarkeit dieser Inhibitoren als spezifische antienzymatische Kontrazeptiva, die die Fertilisation auf der Stufe der Akrosomenreaktion bzw. der zona pellucida Penetration spezifisch unterdrücken.

B.5.7. Immunologische Untersuchungen

Im Immundiffusionstest konnte von verschiedenen Autoren keine Kreuzreaktion zwischen Akrosin verschiedener Spezies und pankreatischem Trypsin bzw. Plasmin festgestellt werden (Morton 1977; Garner et al., 1975; Schleuning et al., 1976).

Eine Ausnahme bilden die Untersuchungen von Stambaugh und Smith (1974); diese Autoren fanden eine immunologische Kreuzreaktion zwischen Trypsin (Rind) und Akrosin (Kaninchen, Bulle, Schaf). Auf Grund mangelnder Färbung auf enzymatische Aktivität besteht jedoch kein schlüssiger Beweis, daß die Präzipitierungslinien von Akrosin herrühren; möglicherweise beruhen diese auf in der Akrosinpräparation enthaltenen Kontaminationen.

Beweiskräftiger ist die Untersuchung von Allen (1977), der bei Verwendung des wesentlich empfindlicheren "enzyme-linked Immunoassay" (ELISA) an Stelle des relativ unempfindlichen Immundiffusionstests keine gemeinsamen antigenen Determinanten zwischen Trypsin und Akrosin feststellen konnte.

Zwischen Akrosinen verschiedener Säugetierspezies werden unterschiedliche immunologische Kreuzreaktionen beschrieben. Morton

(1977) beschrieb eine im Immundiffusionstest festgestellte Kreuzreaktion zwischen ovinem und bovinem Akrosin. Dazu unterschiedliche Resultate erzielten Garner et al. (1975), die im Verfahren der indirekten Immunfluoreszenzfärbung Kreuzreaktion zwischen Akrosinen mehrerer Säugetierarten nachweisen konnten (Rind, Schaf, Schwein, Pferd, Hund, Katze, Karinchen und Mensch).

Möglicherweise werden beim Verfahren der indirekten Immunfluoreszenzfärbung weniger antigene Bindungsstellen benötigt als beim Immundiffusionstest.

B.5.8. Regulation der Akrosinaktivität in vivo

Die Akrosinaktivität einzelner Spermatozoen kann mit Hilfe der Gelatinolysetechnik nachgewiesen werden (Wendt et al., 1975). An Hand der Aktivitätsmessungen kann der Akrosingehalt pro Spermatozoon berechnet werden. Für Eberspermien wurde von Brown und Hartree (1976) ein Wert von 1×10^{-18} und von Müller-Esterl et al. (1980) ein Wert von $2,4 \times 10^{-17}$ Mol Akrosin pro Spermatozoon angegeben.

Berücksichtigt man das Volumen eines Akrosoms, so berechnet sich eine erstaunlich hohe intraakrosomale Akrosinkonzentration von ca. 2 mM. Bei derart extrem hohen lokalen Proteinasekonzentrationen ist eine exzessive Autoproteolyse auch bei einem intraakrosomalen pH-Wert von 5,0 zu erwarten, sofern nicht effektive Inaktivierungsmechanismen für Akrosin existieren.

Drei Hypothesen für die Regulation der akrosomalen Akrosinaktivität werden derzeit diskutiert.

B.5.8.1. Die irreversible Proenzym-Enzym Aktivierung

Analog zum Trypsin soll Akrosin in einer Speicherform ("Proenzym") im Spermatozoon vorliegen (Meizel und Mukerji, 1975, 1976; Polakoski und Parrish, 1977; Schleuning et al., 1975). Die Aktivierung erfolgt dann durch limitierte Proteolyse (Polakoski und Parrish, 1977).

Meizel und Mukerji (1975, 1976) fanden in der Tat in testikulären und epididymalen Spermien verschiedener Spezies nur inaktives Akrosin, in ejakulierten Spermien war nach Abtrennen der natürlichen Inhibitoren bei pH 3,5 nur eine geringe Akrosinaktivität nachweisbar.

Durch Zusatz von Benzamidin als kompetitivem Inhibitor konnte die Aktivierung unterdrückt und inaktives Proakrosin aus ejakulierten Spermien isoliert werden (Goodpasture et al., 1980; Mukerji und Meizel, 1979; Polakoski und Parrish, 1977; Schleuning et al., 1976).

Für das Proakrosin werden von den verschiedenen Autoren unterschiedliche Molekulargewichte angegeben, was aus der Bildung mehrerer Zwischenstufen im Verlauf der Aktivierung erklärt wird, wobei auf analoge Verhältnisse bei der Aktivierung anderer Proenzyme verwiesen werden konnte (z.B. Prothrombin).

Wo soll nun die Proakrosinaktivierung in vivo stattfinden?

Brown und Harrison (1978) postulieren, daß Akrosin in intakten Spermien als Proakrosin vorliegt; nach Zerstörung der äußeren akrosomalen Membranen kann hingegen freies Akrosin nachgewiesen werden. Daraus schließen die Autoren, daß die Aktivierung in vivo während der Akrosomenreaktion stattfindet. Für diese Hypothese spricht, daß enzymatisch aktives Akrosin aus seinen inaktiven Vorstufen erst zum Zeitpunkt seiner physiologischen Wirkung (zona pellucida-Lysis) gebildet wird.

B.5.8.2. Die reversible Enzym-Inhibitor-Komplexbildung

Brown und Hartree (1975) postulieren die Existenz eines akrosomalen Inhibitors, der nach Brown und Harrison (1978) die Aktivierung von Proakrosin in intakten Spermien hemmt.

Wird das Akrosom zerstört, so wird ein Teil des Inhibitors an das umgebende Medium abgegeben und dadurch die effektive Konzentration für eine Hemmung zu gering; nachfolgend kann also eine Konversion von Proenzym zu Enzym erfolgen.

B.5.8.3. Die Enzym-Phospholipid-Interaktion

Während die irreversible Proenzym-Enzym-Aktivierung und die reversible Enzym-Inhibitor-Komplexbildung als klassische Regulationsmechanismen zur Regulierung der Aktivität gelten, die auch von den sekretorischen und plasmatischen Proteinase wohlbekannt sind, scheint bei der zellulären Proteinase Akrosin eine weitere Möglichkeit zu existieren.

Wie in B.5.3.2. erwähnt, studierten Müller und Fritz (1980) die Interaktion von Akrosin mit synthetischen Phospholipidvesikeln und stellten dabei fest, daß Phospholipide die enzymatische Aktivität des Akrosins nahezu vollständig inhibieren. Die Schlußfolgerung liegt nahe, daß Akrosin auch in vivo mit den Phospholipiden der akrosomalen Membranen assoziiert und damit in inaktiver Form immobilisiert ist. Die Dissoziation von den Membranen - z.B. nach Ablauf der Akrosomenreaktion - würde dann zur vollen Entfaltung der Enzymaktivität führen.

B.6. Aufgabenstellung und Strategie

Die Aufgabe dieser Arbeit war die proteinchemische Charakterisierung und die Aufklärung der Primärstruktur von Akrosin, einer zellulären Proteinase, die im Akrosom von Spermien gelagert ist.

Voraussetzung für das Verständnis der Funktion von Proteinen ist die Kenntnis ihrer Struktur. Durch die Ermittlung der Sequenz und daran anschließend der Tertiärstruktur können verwandtschaftliche Beziehungen erkannt und daraus auf Funktion und Evolution geschlossen werden. Durch den Vergleich der Primärstrukturen homologer Proteine können invariable Bereiche determiniert werden, die für die Funktion des Moleküls essentiell sind, wie z.B. aktive Zentren, Substrat- und Membranbindungsstellen. Auch können unterschiedliche Verhaltensweisen homologer Proteine nur über die Unterschiede in der Primärstruktur, die sekundär zu Veränderungen der Raumstruktur führen können, verstanden werden. Somit schien es sehr lohnend, die Untersuchung der Primärstruktur dieser biologisch interessanten und medizinisch wichtigen Proteinase in Angriff zu nehmen.

Die beabsichtigte automatische Sequenzierung bestimmte den Plan des Vorgehens, da mit dieser Technik die Analyse längerer Teilsequenzen mit relativ geringem Materialaufwand möglich ist. Da das Molekül zu groß ist, um es in einer einzigen Abfolge sequenzieren zu können, wurde eine stufenweise Fragmentierung in grössere Bruchstücke angestrebt, die nach gezielter Isolierung für die automatische Sequenzierung geeignet sind und die Zuordnung kleinerer Bruchstücke aus den enzymatischen Hydrolysen ermöglichen.

C. MATERIAL UND METHODEN

C.1. Apparate

Photometer

Die UV-Absorptionsspektren von 340 - 220 nm wurden mit einem Spektralphotometer ACTA III, Beckman Instr., Palo Alto, California, aufgenommen.

Ultrafiltration

Amiconzelle, Modell 8 MC, YM 5-Membran, N₂ (3,5 atm)

Säulenchromatographie

Die optische Dichte der Eluate wurde mit einem Durchflußphotometer Spectrochrom M von Gilson (Abimed, München) bei 280 bzw. 220 nm gemessen.

Automatisch fraktioniert wurde mit einem Microcol TDC 80 Fraktions-sammler von Gilson (Abimed, München).

Die Durchflußgeschwindigkeit der Säulen wurde mit einer 12 000 Varioperpex Pumpe von LKB, München reguliert.

Bei Verwendung von Ultro Pac TSK-Säulen wurde die Durchflußgeschwindigkeit mit einer M-45 Pumpe von Waters, Milford, reguliert.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Peptidtrennungen und die Identifizierung der PTH-Aminosäuren wurden an einem Gerät von Hewlett Packard 1084 A, Hewlett Packard Corp., München, durchgeführt, das mit einem automatischen Proben-

aufgeber und einem auf 254 nm fixierten Wellenlängendetektor ausgestattet ist. Die optische Dichte der Eluate bei den Peptidtrennungen wurde mit einem variablen Wellenlängendetektor Hewlett Packard 1030 B, Hewlett Packard Corp., München, bei 210 nm gemessen.

Elektrophoresen

Kontinuierliche SDS-Elektrophorese: Rundgel-Elektrophoresekammer von Shandon mit Glasröhrchen 80 x 5,0 mm, Spannungsgerät Typ 3371 von LKB, München;

SDS-Gradientengelelektrophorese: Elektrophoresekammer Eigenbau mit Glasplatten 165 x 135 mm, Spannungsgerät Typ 500/100 von DESAGA, Heidelberg;

Entfärberapparatur: Modell der Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel;

Geltrockner: BioRad, Modell 224, BioRad, München;

Scanner: Elscript 1, Hirschmann;

Automatische Sequenzanalyse

Sequenator Modell "Liquid phase sequenator, Prototyp von P. Edman; Spinning cup, 3 000 rpm, Ø 5 cm, Höhe 6 cm; Konvertierung: Automatische angeschlossene Konvertierungsanlage, P-6 Autoconverter, Mass. 02172, Sequemat Inc., Watertown;

Aminosäureanalyse

Aminosäureanalysator LC 4010, Biotronik, München; Säule mit Durrum Harz, Type DC-1A, Durrum Chemical Corp., Palo Alto, California;

Zuckeranalysen

Aminozucker: Aminosäureanalysator LKB Biochrom 4400, LKB, München;

Neutralzucker: Kohlehydratanalysator LC 2000, Biotronik, München;

Säule mit Durrum Harz, Type DA-X 8-11, Durrum Chemical Corp., Palo Alto, California;

C.2. Materialien

C.2.1. Enzyme

Trypsin-TPCK, 290 U/mg, 83% Protein und Chymotrypsin-TLCK, Worthington, Biochem. Corp., Freehold, New Jersey, USA; Protease-S-Aureus V₈, Miles Laboratories Ltd., Stoke Poges, England; Pyroglutamat-Aminopeptidase aus Kalbsleber, 0,5 U, Boehringer GmbH, Mannheim; Thrombinum purum, 100 NIH/O,33 mg, Behringwerke, Marburg; Schweinepankreas-Kallikrein, 1 180 KE/mg, Bayer AG, Wuppertal; Collagenase aus Achromobacter, 2,2 ukat/mg war ein freundliches Geschenk von Prof. B. Keil, Institut Pasteur, Paris; Agkistrodon contortrix Protease, 40 mU/mg, Pentapharm, Basel;

C.2.2. Materialien für die Säulenchromatographie

Sephadex G-100 sf, Sephadex G-50 sf, Sephadex G-10, aktivierte Thiol-Sepharose 4B, Pharmacia, Uppsala, Schweden; Ultro-Pac Säulen: TSK-6 2000SW ($10 \pm 2 \mu$), TSK-6 3000SW ($10 \pm 2 \mu$), Vorsäule: TSK-6 SWP ($10 \pm 2 \mu$), LKB, München;

C.2.3. Materialien für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Für die Trennung der Ketten: Reversed-Phase-Fertigsäule Vydac-TPRP 10, 25 x 0,46 cm, Chrompack, Middleburg, Niederlande);

Acetonitril (Lichrosolv), Merck, Darmstadt; Trifluoressigsäure, Serva, Heidelberg;

Für die Trennung der Peptide: Reversed-Phase-Fertigsäule Hibar RT 250-4, Lichrosorb RP-18 (5 μ), Merck, Darmstadt; Acetonitril (Uvasol), Ammoniumacetat p.A., Orthophosphorsäure, Merck, Darmstadt;

Für die Identifizierung der PTH-Aminosäuren: Reversed-Phase-Fertigsäule Hibar RT 250-4, Lichrosorb RP-18 (5 μ), Merck, Darmstadt; Acetonitril p.A. zur Rückstandsanalyse, Natriumacetat p. A., Dichloräthan p.A., Merck, Darmsatdt;

C.2.4. Materialien für die Elektrophoresen

Acrylamid, reinst, N,N'-Methylenbisacrylamid, reinst, Natriumdo-decylsulfat, krist., reinst, salzfrei, 99%, TMED (N,N,N',N'-Tetramethylen-äthylendiamin, Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva, Heidelberg; Ammoniumoxosulfat p.A., Merck, Darmstadt; Bromphenolblau, Molekulargewichtsstandard I, BioRad Laboratories, Richmond; Molekulargewichtsstandard II, BRL GmbH, Neu-Isenburg;

C.2.5. Materialien für die Fluorographie

Diisopropylfluorophosphat (1,3-¹⁴G) (NEC-378), NEN, Boston, USA; Dimethylsulfoxid p.A., 2,5-Diphenyloxazol (PPO), Merck, Darmstadt; Filterpapier Nr. 604, Schleicher u. Schüll, Dassel; X-Omat-Film, DX-80 Entwickler, Kodak;

C.2.6. Materialien für die Sequenzanalyse

C.2.6.1. Materialien für die automatische Sequenzanalyse

Triäthylamin, zur Synthese, Heptan (Uvasol), Essigsäure 100%, p.A., indifferent gegen Chromsäure, 1,2-Dichloräthan p.A. (Li-Chrosorb), Methanol p.A., Merck, Darmstadt; Benzol zur Sequenzanalyse, Butylchlorid zur Sequenzanalyse, Essigsäureäthylester zur Sequenzanalyse, Phenylisothiocyanat puriss., Trifluoressigsäure zur Sequenzanalyse, Propanol zur Sequenzanalyse, Fluka AG, Buchs, Schweiz; n-Heptafluorbuttersäure, 3m GmbH, Frankfurt; Quadrol^R, Polybrene, Pierce, Rockford; Heptafluorbuttersäure, Phenylisothiocyanat, Polybrene und Quadrol wurden nach der Vorschrift von Edman und Henschen (1975) gereinigt.

C.2.6.2. Materialien für die manuelle Sequenzanalyse

Dimethylallylamin zur Sequenzanalyse, Pierce, Rockford; Essigsäure 100%, p.A., Propanol p.A. 1,2-Dichloräthan p.A., Merck, Darmstadt; Benzol zur Sequenzanalyse, Phenylisothiocyanat puriss., Fluka AG, Buchs; Äther zur Narkose, Höchst AG, Frankfurt;

C.2.7. Materialien für die Aminosäureanalysen

Puffer: Durrum, Pico Puffer, System III, Durrum Chemical Corp., Palo Alto, California; Salzsäure p.A., rauchend, min.37%, tri-Natriumcitrat-2-hydrat p.A., Pyridin p.A., Merck, Darmstadt;

C.2.8. Materialien für die Zuckeranalysen

Kaliumtetraborat p.A., Riedel-de-Haen, Hannover; Cu^{++} /Neocuproin (2,9-Dimethyl-1,10-Phenanthrolin), Merck, Darmstadt;

C.2.9. Andere Materialien

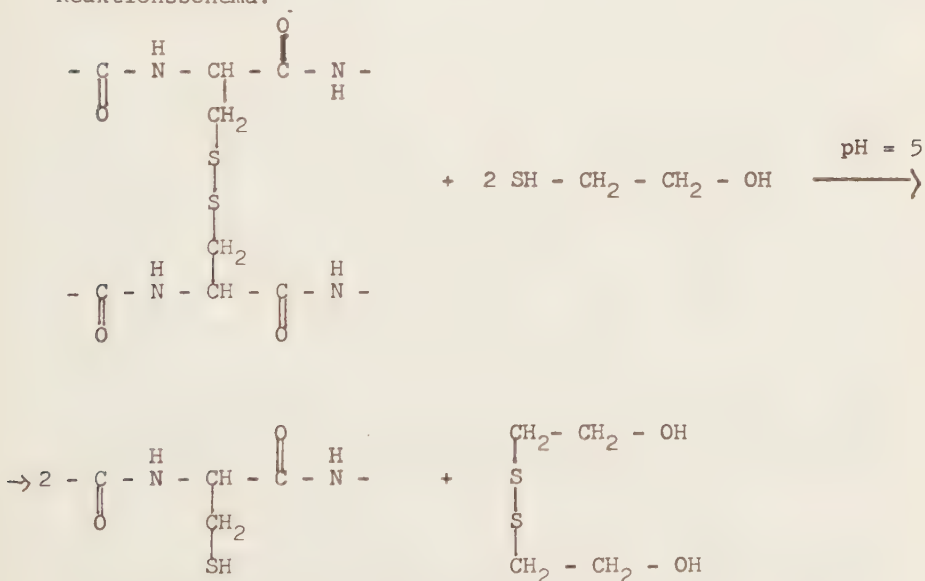
2-Mercaptoäthanol, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn bei München;
Jodessigsäure, Titriplex III, Tris Base, Harnstoff, Guanidin-
hydrochlorid, Bromcyan, Calciumchlorid, min.95% CaCl_2 , Trifluor-
essigsäure zur Synthese, Triton X-100, Brij 35, Merck, Darmstadt;
Diisopropylfluorophosphat, Serva, Heidelberg; BNPS-Skatol (3-
Bromo-3-methyl-2-(2-nitrophenylsulfonyl)-3H-indol), Pierce Chem.
Comp., Rockford, USA;
Alle Substanzen waren vom höchsten, im Handel erhältlichen Rein-
heitsgrad.

C.3. Methoden

C.3.1. Modifikationsreaktionen

C.3.1.1. Mercaptolyse der Disulfidbrücken (Henschen und Edman, 1972)

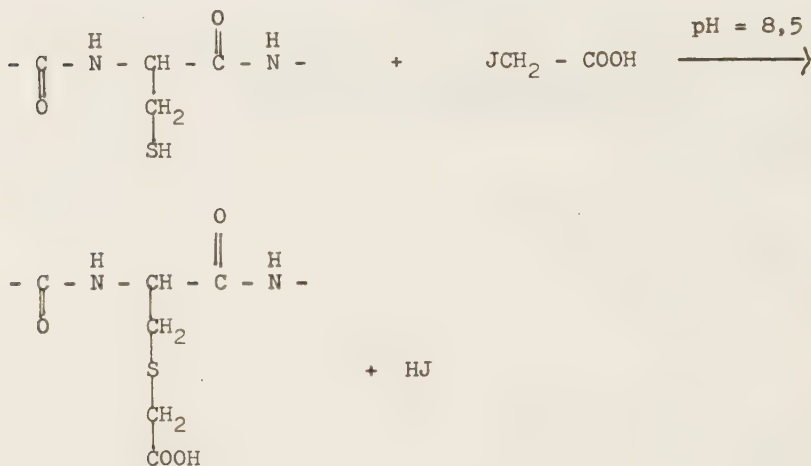
Reaktionsschema:



8 mg (200 nMol) Akrosin wurden gelöst in 500 µl einer Lösung folgender Zusammensetzung: 6 M Guanidin/HCl, 0,2 M Essigsäure, 0,1 M TRIS, 5 mM EDTA, pH 5,0 mit Eisessig. Unter N₂ wurden 25 µl Mercaptoäthanol zugefügt. Die Präparation wurde 24 Stunden bei 40°C unter N₂ im Wasserbad inkubiert.

C.3.1.2. Carboxymethylierung der freien SH-Gruppen (Henschen und Edman, 1972)

Reaktionsschema:



0,08 g Jodessigsäure wurden in einem mit Alufolie umwickelten Reagenzglas gelöst in 500 µl 6 M Guanidin/HCl, 2 M TRIS, pH 9,0 mit 5 N NaOH. Diese Lösung wurde zu der mercaptolysierten Akrosinlösung gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden weitere 25 µl Mercaptoäthanol hinzugefügt, um überschüssiges Reagens abzufangen; der pH wurde mit Ameisensäure auf 2,5 eingestellt. Anschließend wurde das Gemisch sofort auf eine Sephadex G100 Säule aufgegeben und mit 7 M Harnstoff/1 M HCOOH eluiert.

C.3.1.3. DFP-Inaktivierung

10 μ l DFP wurden mit 50 μ l 2-Propanol und 100 μ l 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,8 versetzt. Zu dieser Lösung wurden ca. 100 μ g Akrosin, gelöst in 50 μ l 1 mM Ammoniumformiat, pH 6,0, gegeben. (In dieser Reihenfolge, um Autoproteolyse bei pH 7,8 zu verhindern.) Das Gemisch wurde 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde überschüssiges DFP im Vakuum entfernt, die Probe im Exsiccator getrocknet und in 40 μ l Elektrophoresepuffer aufgenommen. 20 μ l wurden auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen.

C.3.1.4. Radio-Markierung

1 mg (25 nMol) Akrosin wurde in 100 μ l 1 mM Ammoniumformiat, pH 6,0, gelöst. Dazu wurde 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,8, gegeben. Von 0,18 mg einer ($C_{1,3}$ - ^{14}C) DFP-Präparation in 0,5 ml Propylenglykol mit der spezifischen Aktivität von 103 mCi/mMol wurden 12,5 μ Ci (125 nMol) abgenommen und zu der Akrosinlösung gegeben (= 5facher molarer Überschuß). Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten wurden zwei Proben zu je 40 μ l vom Inkubationsgemisch abgenommen, überschüssiges DFP im Vakuum entfernt und die Proben im Exsiccator getrocknet. Jede Probe wurde in 20 μ l Elektrophoresepuffer aufgenommen und einer kontinuierlichen SDS-Elektrophorese in einem 10%igen Acrylamidgel unterzogen.

C.3.2. Chromatographische Trennungen

Die Bedingungen für die chromatographischen Trennungen sind jeweils in der Legende zu den einzelnen Abbildungen angegeben. Die Fraktionen wurden wie in den Abbildungen gezeigt, vereinigt. Proben, die in Ameisensäurer Harnstofflösung isoliert worden waren, wurden anschließend durch Gelfiltration über Sephadex G10

in 1 M HCOOH entsalzt. Die flüchtigen Puffer wurden durch Gefrier Trocknung oder durch Einrotieren im Wasserstrahlvakuum bei 37°C entfernt.

Proben, deren Molekulargewichte über der Ausschlußgrenze der YM 5 Membran lagen (Ausschlußgrenze ca. MW 5 000) wurden mit Hilfe der Ultrafiltration entsalzt. Dazu wurden die Fraktionen in einer Amiconzelle konzentriert, anschließend wurde mit dem 5-fachen Volumen 1 M HCOOH diafiltriert.

C.3.3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Lösungsmittel wurden vor Verwendung filtriert und gründlich entgast.

Die verwendeten Reversed-phase-Fertigsäulen wurden vor Benützung mit Methanol und anschließend mit einem Leergradienten gespült. Wenn die Peaks eine Verbreiterung oder "tailing" zeigten, wurde die Säule mit reinem Acetonitril gespült oder die Durchflußrichtung umgekehrt.

Da die verwendeten Lösungsmittel flüchtig waren, konnten die getrennten Komponenten sofort nach zweimaligem Abdampfen und Aufnehmen in destilliertem Wasser für weitere Analysen eingesetzt werden.

C.3.3.1. Trennung der Ketten

HPLC-Bedingungen:

Lösungsmittel A: 0,1% Trifluoressigsäure

Lösungsmittel B: 0,1% Trifluoressigsäure, Acetonitril 100%

Gradient: 5 Minuten isokratische Elution mit einer Konzentration von 5% B, dann linearer Gradient von 5 bis 70% B in 60 Minuten

Durchflußgeschwindigkeit: 1,5 ml/min

Temperatur: 40°C (Ofen und Lösungsmittel)
Wellenlänge: 210 nm
Empfindlichkeit: 0,025 AUFS
Probenvolumen: 200 µl

C.3.3.2. Peptidtrennungen

HPLC-Bedingungen:

Lösungsmittel A: 0,025 M Ammoniumacetat, pH 6,0 mit Ortho-phosphorsäure
Lösungsmittel B: 0,05 M Ammoniumacetat, pH 6,0 mit Ortho-Phosphorsäure : Acetonitril = 50 : 50 (v/v)
Gradient: 5 Minuten isokratische Elution mit einer Konzentration von 5% B, dann linearer Gradient von 5 bis 80% B in 65 Minuten
Durchflußgeschwindigkeit: 1,5 ml/min
Temperatur: 40°C (Ofen und Lösungsmittel)
Wellenlänge: 210 nm
Empfindlichkeit: 0,025 AUFS
Probenvolumen: 200 µl

C.3.3.3. Identifizierung der PTH-Aminosäuren (Lottspeich 1980)

Die Identifizierung der bei der automatischen Sequenzierung erhaltenen PTH-Aminosäuren erfolgte durch HPLC auf Grund der verschiedenen Retentionszeiten. Als Referenz dienten Gemische von PTH-Aminosäuren.

Die Trennung erfolgte in einem isokratischen System.

HPLC-Bedingungen:

Lösungsmittel: 68,5% 0,01 M Natriumacetat, pH 5,2, 31,5% Acetonitril, 0,5% Dichloräthan
Durchflußgeschwindigkeit: 1,5 ml/min

Temperatur: 62°C (Ofen)
Analysenzeit: 16 min
Nachweisgrenze: 5 pMol

C.3.4. Elektrophoretische Methoden

Die Probenmenge betrug bei allen elektrophoretischen Trennungen 20 - 50 µg. Aufgegeben wurden die Proben in einem Probenpuffer-volumen von 20 µl. Bei Bedarf wurde vor der Elektrophorese eine Reduktion der Proben durchgeführt; dabei wurde 5% Mercaptoäthanol zur jeweiligen Probe gegeben und die Probelösung vor dem Auftragen auf das Gel 3 Minuten bei 100°C inkubiert. Als Referenz diente entweder ein Markergemisch I aus Lysozym (MG 14 300), Sojabohnen-Trypsininhibitor (MG 21 000), Carboanhydrase (MG 30 000), Ovalbumin (MG 45 000), Rinderserumalbumin (MG 68 000) und Phosphorylase B (MG 94 000), oder ein Markergemisch II aus Ovalbumin (MG 45 000), α -Chymotrypsinogen (MG 25 700), β -Lactoglobulin (MG 18 400), Lysozym (MG 14 300), Cytochrom C (MG 12 300), Trasylol (MG 6 200) und Insulin (MG 3 000). Als Frontmarker wurde Bromphenolblau eingesetzt, die Markerfront wurde mit Chinatusche fixiert. Die Anfärbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R-250 in Methanol/Eisessig/H₂O (45 : 5 : 50, v/v/v).

Entfärbt wurde mit Methanol/Eisessig/H₂O (25 : 10 : 65, v/v/v). Nach der Entfärbung wurden die Gele getrocknet.

C.3.4.1. Kontinuierliche SDS-Elektrophorese (Weber und Osborn, 1975)

Verwendet wurde ein 10%iges Acrylamidgel mit 0,1% SDS, 0,15% TMED und 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von 5 mA/Gel bei einer Laufzeit von 5 Stunden.

C.3.4.2. Diskontinuierliche SDS-Elektrophorese (Lämmli 1970)

Verwendet wurde ein 5 - 25%iges Polyacrylamid-Gradientengel. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Spannung von 8 V/cm bei einer Laufzeit von 5 - 7 Stunden.

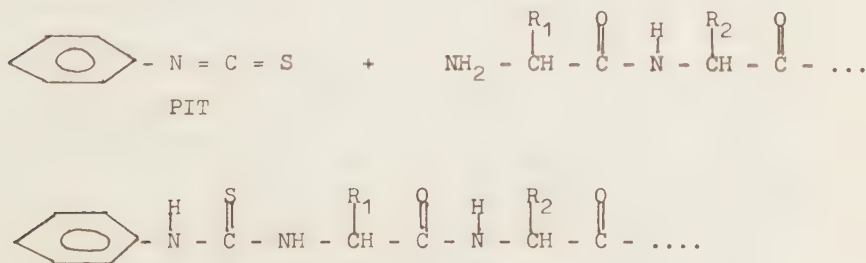
C.3.4.3. Autoradiographie

Die mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbten Rundgele wurden in der Längsrichtung in Scheiben geschnitten und 30 Minuten in einem 20-fachen Volumen Dimethylsulfoxid inkubiert. Anschließend wurde das Gel 3 Stunden in einem 4-fachen Volumen an 20% (w/w) 2,5-Diphenyloxazol (PPO) in Dimethylsulfoxid geschüttelt (PPO wirkt als Szintillator). Nach mehrmaligem Waschen in destilliertem Wasser wurde das Gel unter Vakuum auf Filterpapier getrocknet, anschließend für 24 Stunden bei -70°C auf einen X-Omat Film gelegt und schließlich entwickelt.

Die erhaltenen Banden wurden in einem Scanner vermessen.

C.3.5. Sequenzanalyse (Edman und Henschen, 1975)

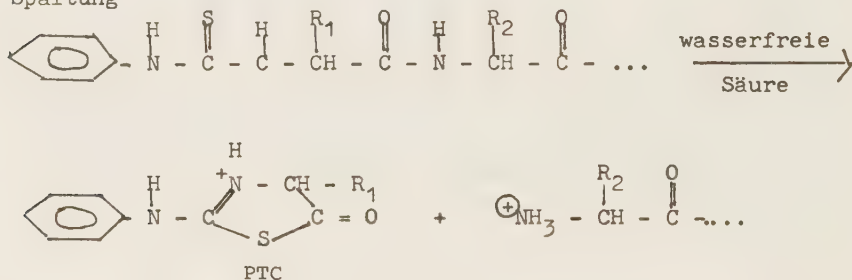
Reaktionsschema:



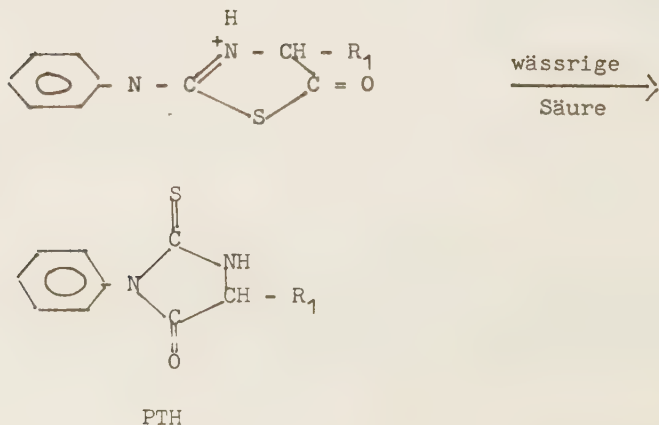
Der pH-Bereich wurde zwischen 9 und 9,5 gewählt, da Phenylisothiocyanat (PIT) nur mit unprotonierten Aminogruppen reagiert, oberhalb pH 10 aber instabil ist.

Das Reaktionsgemisch muß frei von Aldehyden sein und darf möglichst keinen Sauerstoff enthalten. Aldehyde bilden mit den α -Aminogruppen Schiff'sche Basen, die den Abbau blockieren. Sauerstoff verursacht einen oxidativen Schwefelaustausch, das gebildete Phenylisocyanat reagiert zwar mit der α -Aminogruppe, doch findet keine nachfolgende Spaltung statt.

Spaltung

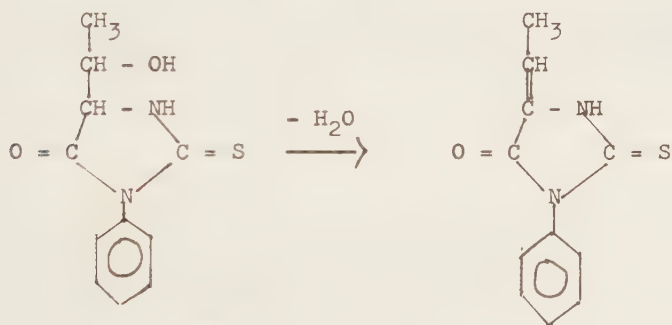


Konvertierung



Dabei muß wieder auf Sauerstoffabwesenheit geachtet werden, um einem oxidativen Austausch des Schwefels gegen Sauerstoff vorzubeugen.

Folgende Aminosäuren erfahren bei diesem Vorgang eine Veränderung: PTH-Threonin reagiert teilweise unter Wasserabspaltung zum β -Eliminierungsprodukt.



Ebenso, sogar in größerem Ausmaß, reagiert PTH-Serin, jedoch ist das "Dehydroderivat" nicht so stabil wie bei Threonin.

PTH-Asparagin und PTH-Glutamin werden bei der Konvertierung teilweise zu freien Säuren desamidiert, was jedoch für die Identifizierung von Vorteil ist, da PTH-Glutamin und PTH-Serin bei den gleichen Retentionszeiten der Hochdruckflüssigkeitschromatographie eluiert werden und somit nicht eindeutig identifiziert werden können. Da jedoch PTH-Glutamin immer durch Desamidierung von der freien Säure begleitet wird, ist eine Unterscheidung von PTH-Serin eindeutig möglich.

C.3.5.1. Durchführung der automatischen Sequenzanalyse

Der schrittweise Thiazolinonabbau erfolgt in einem rotierenden, zylindrischen Glascup. An der Wand des rotierenden Glascups

wird eine Proteinlösung als dünner Film aufgetragen. Dieser kann leicht von einem zweiten, sich darüber ausbreitenden, nicht mischbaren Film extrahiert werden, kann zentrifugiert und unter niedrigem Druck getrocknet werden. Für den Abbau von kleineren Peptiden wurde der Proteinlösung Polybren beige-mischt.

Im Sequenator laufen nur die Kupplungs- und Spaltungsreaktionen ab. Der Konvertierungsvorgang wird außerhalb des Gerätes in einer angeschlossenen automatischen Konvertierungsanlage durchgeführt.

Kupplung

Das Protein bzw. Peptid wurde in 0,4 ml Wasser unter Zusatz von 1 - 2 Tropfen Triäthylamin gelöst und auf die Glaswand des Cups aufgetragen. Das Puffermedium war ein Gemisch aus Quadrol in n-Propanol-Wasser (2 : 43 : 55, v/v/v) mit einem pH-Wert von 9,0. PIT wurde als 5%ige (v/v) Lösung in Heptan zugefügt. Danach wurden durch Extraktionen mit Benzol und Essigsäureäthylester, der 0,1% Essigsäure enthält, unerwünschte Nebenprodukte und Überschuß an Reagens entfernt.

Für den Abbau von kleineren Peptiden wurde die Reaktionszeit verkürzt.

Spaltung

Als wasserfreie Säure wird hier n-Heptafluorbuttersäure verwendet. Nach dem Abdampfen der Säure wurde die abgespaltene Aminosäure mit 1-Chlorbutan extrahiert. Das restliche Peptid bleibt als Film an der Wand des Cup und kann weiter schrittweise abgebaut werden. Die 1-Chlorbutanphase wurde der automatischen Konvertierungsanlage zugeführt.

Der Spaltungsvorgang wurde zweimal durchgeführt um zu verhindern, daß durch unvollständige Spaltung während eines längeren Sequenatorlaufes zu große Überlappungen entstehen.

Beim Abbau von kleineren Peptiden wurde nur eine einfache Spaltung durchgeführt.

Konvertierung

Die Konvertierung erfolgte automatisch nach der Vorschrift von Wittman-Siebold et al. (1976) in 20%iger wässriger Trifluoressigsäure.

Die einzelnen Fraktionen wurden nach der Konvertierung manuell bis zur Trockene eingedampft, mit 100 μ l Acetonitril gelöst und durch HPLC identifiziert.

C.3.5.2. Durchführung der manuellen Sequenzanalyse (Peterson et al., 1972)

Kupplung

Das Protein bzw. Peptid wurde in 100 μ l Kupplungspuffer (1,185 ml Dimethylallylamin, 15 ml 1-Propanol, 10 ml dest. Wasser, pH 9,5 mit Trifluoressigsäure) gelöst.

5 μ l PIT wurden unter Stickstoff zugegeben und das Reaktionsgemisch für 20 Minuten in ein Wasserbad von 50°C gestellt. Sodann wurde mit 0,5 ml Benzol extrahiert und die Benzolphasen jeweils nach Zentrifugation mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Der Rückstand wurde zuerst bei 50°C unter Stickstoff, dann 60 Minuten bei 50°C an der Ölpumpe getrocknet.

Spaltung

Zu dem nun trockenen PTC-Peptid wurden 100 μ l konzentrierte Trifluoressigsäure hinzugefügt und die Probe 7 Minuten bei 50°C im Wasserbad stehengelassen. Danach wurde die Trifluoressigsäure mit

Stickstoff abgedampft und dabei der Rest als Film an der Glaswand gleichmäßig verteilt. Mit 1 ml Äther wurde die abgespaltene Anilinthiazolinon-Aminosäure extrahiert.

Konvertierung

Die Ätherphase wurde unter Stickstoff zur Trockene eingedampft, mit 100 µl Acetonitril gelöst und durch HPLC identifiziert.

C.3.6. Aminosäureanalysen (Spackman et al., 1958; Liu und Chang, 1971)

Zu den ca. 50 - 100 µg Protein enthaltenden Proben wurden 0,2 ml 5,7 N Salzsäure gegeben und die Röhrchen unter Vakuum zugeschmolzen, wobei das Vakuum nicht schlechter als 0,1 mm Hg sein durfte, um eine Zerstörung des S-Carboxymethylcystein zu verhindern. Die abgeschmolzenen Reagensgläser wurden für 24 oder 72 Stunden in einen Heizblock bei 110°C gestellt. Danach wurden die Röhrchen geöffnet, die Salzsäure unter Vakuum abgedampft, der Rückstand in 1 ml dest. Wasser aufgenommen, mit Pyridin auf pH 6,5 gebracht, eine Stunde bei 105°C im Trockenschrank stehengelassen und die Lösung abgedampft. Diese Behandlung diente dazu, das mit Homoserin im Gleichgewicht vorliegende Homoserinlaktat in die freie Säure umzuwandeln.

Proben, die nicht S-carboxymethyliert waren, wurden einer Cysteinbehandlung unterzogen. Dazu wurde der pH-Wert mit Pyridin auf 6,0 eingestellt, 4 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen und die Lösung abgedampft. Die Probe wurde in 0,5 ml 0,2 M Natriumcitratpuffer, pH 2,2, aufgenommen und auf den Aminosäureanalyser aufgegeben.

C.3.7. Zuckeranalysen

50 nMol Glykoprotein wurden gelöst in 250 μ l dest. Wasser. 50 μ l (10 nMol) dieser Lösung wurden 6 Stunden hydrolysiert mit 1 ml 6 N Salzsäure und 10 μ l β -Mercaptoäthanol. Das Hydrolysat wurde zentrifugiert und der Überstand zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde die Probe in 200 μ l 0,2 M Natriumcitratpuffer, pH 2,2 aufgenommen und zur Bestimmung der Aminosucker auf einen Aminosäureanalysator gegeben.

Zu den restlichen 200 μ l (40 nMol) der Glykoproteinlösung wurden 200 μ l 0,1 M Schwefelsäure hinzugefügt. Nach einer Hydrolysezeit von 1 Stunde bei 80°C wurde ein Aliquot von 100 μ l (10 nMol) abgenommen für die Bestimmung von Sialsäure nach der Methode von Aminoff (1961).

Die verbliebenen 300 μ l (30 nMol) des Glykoprotein/Schwefelsäuregemisches wurden 24 Stunden bei 110°C hydrolysiert. 200 μ l (20 nMol) wurden ohne vorherige Neutralisation auf den Kohlehydratanalysator gegeben und durch Ionenaustauschchromatographie mit einem Kaliumboratpuffer getrennt (Stephens et al., 1974). Die Detektion der Neutralzucker erfolgte bei 440 nm mit einem frisch bereiteten Cu^{++} /Neocuproine-Reagens.

C.3.8. Bestimmung des Proteingehaltes

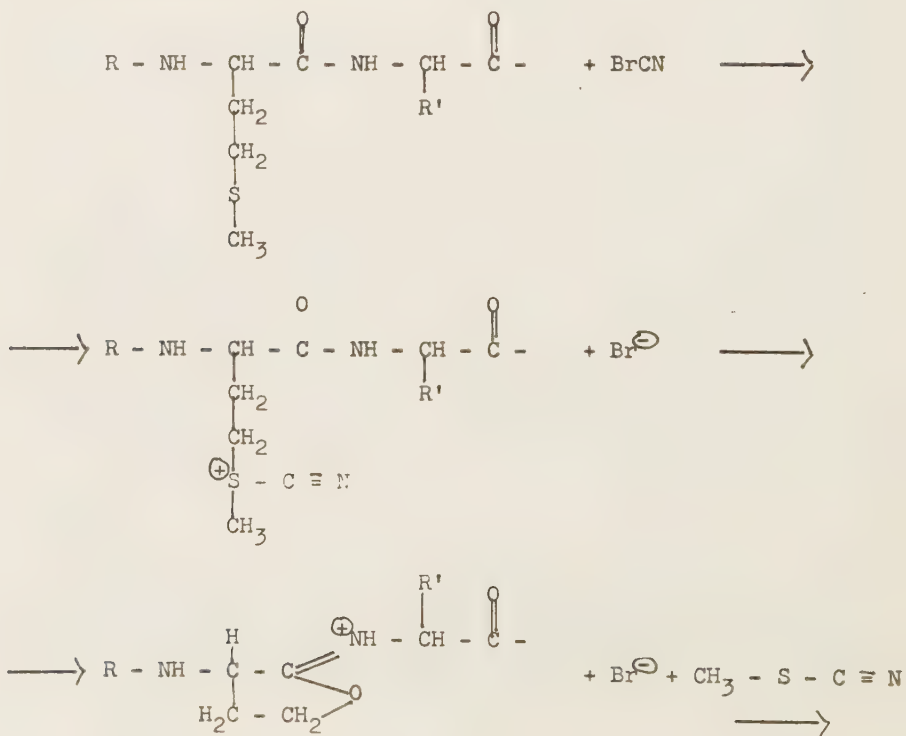
Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte entweder durch quantitative Aminosäureanalyse oder durch Aufnahme von Absorptionsspektren von 340 - 220 nm mit einem Spektralphotometer und Berechnung der Extinktion bei 280 nm.

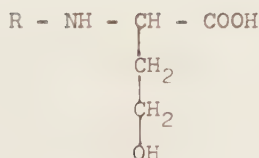
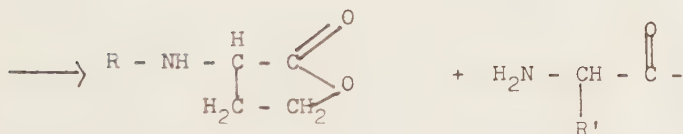
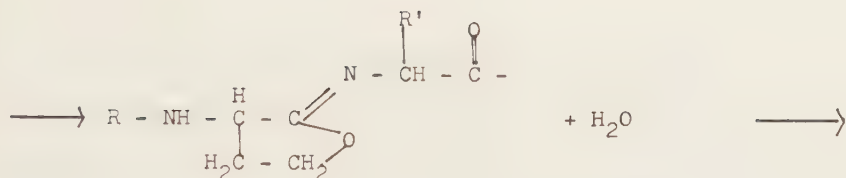
C.3.9. Methoden zur Spaltung von Peptidbindungen

C.3.9.1. Chemische Spaltung

C.3.9.1.1. Bromcyanspaltung
(Gross und Witkop, 1961)

Reaktionsschema:





Vorversuche:

100 µg ($\hat{=}$ 2,5 nMol) natives Akrosin oder reine, S-carboxymethylierte schwere Kette wurden in 100 µl 70%iger Ameisensäure gelöst. Dazu wurden in verschiedenen Inkubationsansätzen entweder 0,5 mg, 1 mg oder 10 mg Bromcyan, gelöst in jeweils 100 µl 70%iger Ameisensäure, gegeben. Diese Reaktionslösungen wurden zwischen 12 und 48 Stunden im Dunkeln gelassen. Zur Beendigung der Reaktion wurde die Mischung 1: 10 mit dest. Wasser verdünnt und auf dem Rotationsverdampfer eingengt; dieser Vorgang wurde wiederholt. Nach dem Lyophilisieren wurde von jedem dieser Ansätze eine Aminosäureanalyse mit Homoserinbehandlung durchgeführt.

Spaltung von S-carboxymethylierter schwerer Kette
nach vorheriger Reduktion der Methionine

75 nMol reine, S-carboxymethylierte schwere Kette wurden in 250 µl Ammoniumhydrogencarbonatlösung, pH 8,0 gelöst. Unter Stickstoff wurden 5 µl Mercaptoäthanol zugegeben und das Gemisch 24 Stunden bei Raumtemperatur gelassen. Anschließend wurde die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt, in 200 µl 70%iger Ameisensäure aufgenommen, eine Lösung von 30 mg Bromcyan in 200 µl 70%iger Ameisensäure zugegeben und 24 Stunden im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zweimal mit dem 10-fachen Volumen dest. Wasser verdünnt und Bromcyan abgedampft. Das Spaltgemisch wurde in 200 µl 0,04% Trifluoressigsäure aufgenommen und auf eine TSK-Säule gegeben.

Spaltung von S-carboxymethylierter leichter Kette
nach vorheriger Reduktion der Methionine

25 nMol S-carboxymethyliertes Ausgangsmaterial wurden durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (s. D.2.2.3.) in leichte und schwere Kette aufgetrennt. Die leichte Kette wurde bei pH 8 reduziert wie bei der Spaltung der schweren Kette beschrieben, um evt. oxidierte Methionine zu reduzieren. .

Nach der Trocknung wurde das Peptid in 100 µl 70%iger Ameisensäure aufgenommen, eine Lösung von 10 mg BrCN in 100 µl 70%iger Ameisensäure zugegeben und 24 Stunden im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Abdampfen mit dem 10-fachen Volumen dest. Wasser wurde mit der Hälfte des Spaltgemisches eine Aminosäurenanalyse ohne vorherige Hydrolyse durchgeführt, der Rest wurde wie in C.3.6. beschrieben hydrolysiert und dann auf den Aminosäureanalyator aufgegeben.

C.3.9.2. Enzymatische Spaltungen

C.3.9.2.1. Limitierte Autoproteolyse

Vorversuche:

300 µg natives Akrosin (7,5 nMol) wurden in 100 µl 1 mM Ammoniumformiat, pH 6,0 gelöst. Anschließend wurden 200 µl 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung zugegeben, der pH-Wert auf 8 eingestellt und 1 Tropfen Toluol zugegeben. Diese Mischung wurde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zwischen 0 und 48 Stunden Inkubationsdauer wurden sechs Proben zu je 50 µl abgenommen, mit Ameisensäure auf pH 2,5 gebracht und gefriergetrocknet. Jede Probe wurde anschließend in 20 µl Elektrophoresepuffer aufgenommen und nach Reduktion mit Mercaptoäthanol einer Gelelektrophorese unterzogen.

Die präparative Durchführung erfolgte mit 75 nMol; die Inkubationsdauer betrug 20 Stunden. Nach Stoppen der Reaktion durch Ameisensäure und Gefrier Trocknung wurde das Gemisch S-carboxymethyliert und anschließend sofort auf einer Sephadex G100 Säule mit einem Puffer aus 7 M Urea/1 M HCOOH aufgetrennt.

C.3.9.2.2. Tryptische Spaltung

Die tryptische Spaltung wurde mit Schweinepankreas-Trypsin durchgeführt, das mit TPCK vorbehandelt war (Kostka und Carpenter, 1964), um evt. vorhandene chymotryptische Aktivität zu inhibieren. Ein geringer Zusatz von Ca^{++} -Ionen sollte eine Autolyse von Trypsin verhindern und das aktive Zentrum in Gegenwart von 2 M Urea stabilisieren.

200 µg natives Akrosin (5 nMol) wurden gelöst in 200 µl 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat, 0,1 mM Calciumchlorid, 2 M Harnstoff, pH 8,5. 1% Trypsin (w/w = 2 µl von einem Ansatz 1 mg/1 ml H_2O) wurde in wässriger Lösung zugegeben. Dieser Inkubationsansatz wurde mit 1 Tropfen Toluol versetzt und bei 37°C im Wasserbad

gehalten. Zwischen 1 Stunde und 22 Stunden Digestionszeit wurden jeweils 50 μ l Probe entnommen, die Reaktion gestoppt durch Zugabe von TLCK (Trypsininhibitor) in einem geringen molaren Überschuß gegenüber der Trypsinprotease. Die Proben wurden gefriergetrocknet, anschließend in jeweils 20 μ l Elektrophoresepuffer aufgenommen und nach Reduktion mit Mercaptoäthanol einer Elektrophorese unterzogen.

Der Ansatz im präparativen Maßstab wurde mit 75 nMol nativem Akrosin durchgeführt; es wurden 30 μ l einer Trypsinlösung (1 mg/1 ml H₂O) zugegeben, was einer Konzentration von 1% entspricht (w/w); die Inkubationsdauer betrug 12 Stunden. Nach Stoppen der Reaktion mit TLCK und Gefriertrocknung wurde das Gemisch S-carboxymethyliert und anschließend auf einer Sephadex G50 Säule in 0,04%iger Trifluoressigsäure aufgetrennt.

C.3.9.2.3. Spaltung mit *Staphylococcus aureus* V8 Protease (Drapeau et al., 1972; Houmard und Drapeau, 1972)

300 μ g (5 nMol) S-carboxymethylierte, reine schwere Kette wurden gelöst in 300 μ l 0,05 M Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7,9. Von dieser Lösung wurden jeweils 100 μ g abgenommen und die verschiedenen Ansätze mit 2% (w/w), 5% (w/w) und 10% (w/w) *Staphylococcus* Protease versetzt, entsprechend einer Menge von 6 μ l, 15 μ l und 30 μ l eines Ansatzes von 100 μ g V8 Protease in 100 μ l Wasser. Nach 2 Stunden Digestion bei 37°C wurde das Lösungsmittel abgedampft und von jedem Ansatz eine Poolsequenz durchgeführt.

Die Digestion wurde in einem Parallelversuch in 0,05 M Ammoniumacetat, pH 4,0 durchgeführt. In weiteren Inkubationsansätzen wurden die Inkubationszeiten bis auf 24 Stunden erhöht.

In einem präparativen Ansatz wurden 2 mg ($\approx$ 50 nMol) S-carboxymethylierte schwere Kette gelöst in 1 ml 0,05 M Ammoniumhydrogencarbonat, pH 4,0. Es wurde 0,1 mg Staphylococcus Protease zugegeben, entsprechend 5% (w/w). Unter Toluolzusatz wurde dieser Inkubationsansatz 24 Stunden bei 37°C gehalten und anschließend sofort durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer "reversed-phase"-Säule Vydac TPRP 10 aufgetrennt.

C.3.9.2.4. Digestion mit Thrombin, Kallikrein, Agkistrodon contortrix, Collagenase

Die Ansätze wurden jeweils mit nativem Akrosin und mit S-carboxymethylierter, reiner schwerer Kette durchgeführt.

Probelösung I: 0,8 mg Akrosin nativ bzw. S-carboxymethylierte schwere Kette in 800 μ l 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7,5 - 8

Probelösung II: 0,2 mg Akrosin nativ bzw. S-carboxymethylierte schwere Kette in 200 μ l 0,05 M Tris, 0,05 M CaCl_2 , pH 7,3 mit Salzsäure

Mit jeweils 100 μ l dieser Lösungen wurden folgende Digestionen durchgeführt:

Thrombin:	2 NIH/100 μ l Probelösung I
Kallikrein:	0,01 mg/100 μ l Probelösung I
Ag.contortrix:	0,01 mg/100 μ l Probelösung I
Collagenase:	0,01 mg/100 μ l Probelösung II
Blindwert I:	100 μ l Probelösung I
Blindwert II:	100 μ l Probelösung II

Nach 2 Stunden und 24 Stunden Digestionsdauer bei 37°C mit Toluol wurden jeweils 50 μ l abgenommen, mit Ameisensäure versetzt um die Reaktion zu stoppen und lyophilisiert. Die Proben wurden in jeweils 20 μ l Elektrophoresepuffer aufgenommen und eine Gelelektrophorese durchgeführt.

C.3.9.2.5. Digestion mit Pyroglutamat-Aminopeptidase (Podell und Abraham, 1978)

Der Pool C₂ nach der Sephadex G100 Chromatographie wurde nach der Entsalzung lyophilisiert und mit 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH

8,0, 5 mM Mercaptoäthanol, 10 mM EDTA, 5% (v/v) Glycerin bei 4°C versetzt. Pyroglutamat-Aminopeptidase (1 : 20) wurde hinzugefügt und das Gemisch unter Stickstoff 9 Stunden bei 4°C gehalten. Nach einem weiteren Zusatz von Pyroglutamat-Aminopeptidase wurde das Gemisch 14 Stunden bei 20°C gehalten. Nach einer Ultrafiltration gegen 1 M Ameisensäure wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt.

C.3.9.2.6. Chymotryptische Spaltung

Zur Spaltung wurde Chymotrypsin verwendet, dessen Trypsinaktivität durch TLCK inhibiert wurde.

3 mg (50 nMol) S-carboxymethylierte schwere Kette wurden gelöst in 1 ml 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat, 0,1 mM Calciumchlorid, 2 M Harnstoff, pH 8,5. 1% Chymotrypsin (w/w = 30 µl eines Ansatzes von 1 mg/1 ml dest. H₂O) wurde in wässriger Lösung zugegeben. Dieser Inkubationsansatz wurde mit 1 Tropfen Toluol versetzt und 3 Stunden bei 37°C im Wasserbad gehalten. Die Reaktion wurde gestoppt durch Umstellung des pH-Wertes auf 2,5 mit Ameisensäure. Das Gemisch wurde sofort auf einer "reversed-phase"-Säule Vydac TPRP 10 aufgetrennt.

C.3.10. Proteolytische Umwandlung von Akrosin MG 45 000 in Akrosin MG 40 000

300 µg Akrosin MG 45 000 (6,6 nMol) wurden in 300 µl 1 M Tris/HCl, pH 6,8 bei Raumtemperatur gelöst.

Zwischen 0 und 4 Stunden Inkubationsdauer wurden sechs Proben zu je 50 µl abgenommen, mit Ameisensäure auf pH 2,5 gebracht und gefriergetrocknet. Jede Probe wurde anschließend in 20 µl Elektrophoresepuffer aufgenommen und nach Reduktion mit Mercaptoäthanol einer Gelelektrophorese unterzogen.

D. E R G E B N I S S E

D.1. Charakterisierung des Ausgangsmaterials

Als Ausgangsmaterial diente das nach B.5.1. isolierte Eberakrosin mit der spezifischen Aktivität von 37 U/mg, wobei BzArg-NHNp als Substrat verwendet wurde.

D.1.1. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Elektrophorese im Polyacrylamidgel (5 - 25% Polyacrylamid) zeigte vor und nach Reduktion der Proben ein zu über 90% reines Protein (Abb.8). Die elektrophoretische Mobilität der reduzierten und nicht reduzierten Probe ist identisch. Die Lokalisation der Hauptbande, bezogen auf einen Referenzlauf mit Markerproteinen, ergibt ein MG von $\sim 40\ 000$. Dieser Wert könnte jedoch zu hoch liegen, da Glykoproteine dazu neigen, bei der Abschätzung der Molekulargewichte mit Hilfe der Gelelektrophorese zu hohe Werte zu ergeben.

D.1.2. Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäurezusammensetzung ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Die Zahlen unter (a) entsprechen den errechneten Resten pro Mol Protein, die Zahlen unter (b) den angenommenen ganzzahligen Werten. Bezugnehmend auf ein MG von 40 000 errechnet sich ein Proteinanteil von 340 Aminosäuren, wobei insbesondere ein sehr hoher Prolinanteil (11%) des Moleküls auffällt.

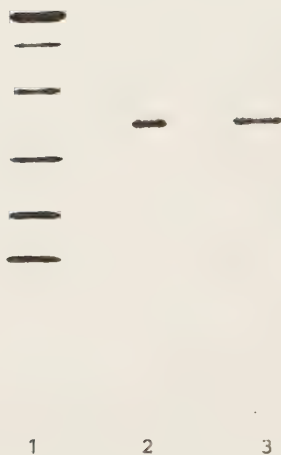


Abb.8 SDS-Elektrophorese
(s. C.3.4.2.)

- 1 Referenzproteine I
- 2 Ausgangsmaterial
nicht reduziert
- 3 Ausgangsmaterial
reduziert

Tab.1 Aminosäureanalyse des Ausgangsmaterials

Amino- säure	Reste	
	natives Akrosin (a)	(b)
Asp	24,5	25
Thr	19,6	20
Ser	17,8	18
Glu	27,0	27
Pro	37,2	37
Gly	33,9	34
Ala	20,0	20
Cys	7,7	8
Val	26,8	27 ⁺
Met	6,1	6
Ile	17,1	17
Leu	24,6	25
Tyr	9,9	10
Phe	10,5	11
Lys	15,9	16
His	6,7	7
Arg	27,0	27
Trp	n.b.	7/ 5 ⁺⁺
Glc Nac	5,4	5
Total		340

⁺ Wert nach 72 h Hydrolyse

⁺⁺ Aus der Sequenzanalyse

(a) berechnete Aminosäure/Mol Protein

(b) ganzzahlige Werte

n.b.nicht bestimmt

D.1.3. Zuckeranalyse

Der Kohlehydratgehalt wurde nach schwefelsaurer Hydrolyse in einem Kohlehydratanalysator bestimmt (s. C.3.7.).

In Tabelle 2 ist die Kohlehydratzusammensetzung des Ausgangsmaterials angegeben, durchgeführt mit der benötigten Mindestmenge von 50 nMol Glykoprotein. Als einziger Aminosucker ist Glukosamin im Molekül enthalten. Der prozentuale Gesamtkohlehydratanteil beträgt 3,75%.

D.1.4. N-terminale Aminosäuresequenz des Ausgangsmaterials

Ein wichtiges Kriterium für die Reinheit und Einheitlichkeit von Proteinen ist die N-Terminalsequenz. Daher wurde zur Charakterisierung des Ausgangsmaterials ein automatischer N-terminaler Abbau von 4 Schritten durchgeführt (s. C.3.5.). Im 1., 2. und 4. Schritt zeigten sich 2 Aminosäuren in fast äquimolaren Mengen. Im 3. Schritt war nur eine Aminosäure enthalten. Außer den in Abbildung 9 angegebenen Sequenzen wurden keine weiteren Aminosäuren gefunden, die auf eine Verunreinigung des Ausgangsmaterials hindeuten würden.

1. Schritt:	Val, Arg,
2. Schritt:	Val, Asp,
3. Schritt:	Gly,
4. Schritt:	Gly, Ala,

Abb.9 N-terminale Aminosäuresequenz des Ausgangsmaterials

Die Symbole für die Aminosäuren sind im Abschnitt "Abkürzungen und Symbole" erklärt.

Tabelle 2 Kohlenhydratzusammensetzung von nativem Akrosin

Glykoprotein	NANA Mol/Mol		GalNac Mol/Mol		GlcNac Mol/Mol		Man Mol/Mol		Fuc Mol/Mol		Gal Mol/Mol		Glc Mol/Mol		Gesamtkohlenhydratanteil (Gew. %)
Eberakrosin MG 40 000	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	
	0	0	0	0	5,4	5	2,4	2	0,7	1	0,83	1	0	0	3,75

a = errechnete Mol/Mol
b = ganzzahlige Werte

D.2. Untereinheiten des Akrosins

Das Auftreten von zwei Aminosäuren in jedem Abbauschritt ließ auf die Anwesenheit von 2 Polypeptidketten in der Akrosinpräparation schließen. Da die SDS-Elektrophorese des nativen Ausgangsmaterials vor und nach Reduktion neben einer Hauptbande bei MG 40 000 keine zweite Bande in gleicher Stärke zeigte (s. Abb. 8), wurde angenommen, daß die zweite Polypeptidkette entweder von gleicher Größe ist und somit die gleiche elektrophoretische Mobilität besitzt, oder aber ein sehr kleines Molekül ist, welches in der SDS-Elektrophorese aus dem Gel wanderte.

Weiterhin stellte die Anwesenheit einer zweiten Polypeptidkette im Ausgangsmaterial folgende Fragen:

- a) Handelt es sich bei beiden Polypeptidketten um Bestandteile des Akrosinmoleküls?
- b) Wie sind die beiden Komponenten miteinander verknüpft?

Zur Klärung dieser Fragen wurde primär eine Separierung der beiden Polypeptidketten angestrebt.

D.2.1. Versuche zur Kettentrennung ohne vorherige Reduktion

D.2.1.1. Gelfiltration an Sephadex G100 unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Eine Elution des nativen Ausgangsmaterials über Sephadex G100 in 1 M Ameisensäure zeigte keine Fraktionierung der zwei Ketten. Der Verlauf der Chromatographie ist in Abbildung 10 wiedergegeben.

Die proteinhaltige Fraktion wurde in 3 Teilen gepoolt. Die einzelnen Pools wurden jeweils N-terminal durch automatische Sequenzanalyse untersucht. In jedem Pool zeigten sich die bekannten 2 Sequenzen des Ausgangsmaterials.

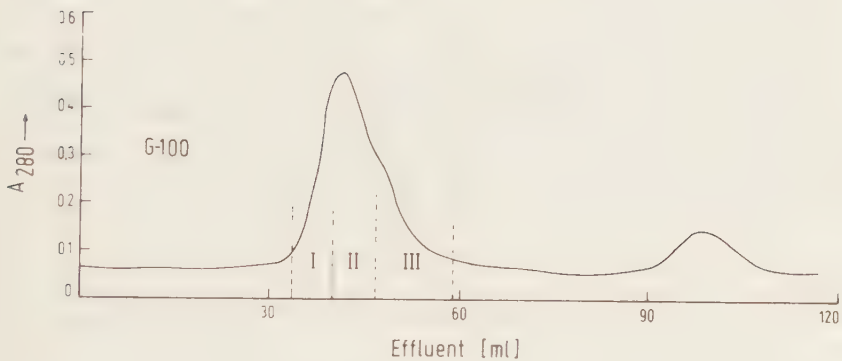


Abb.10 Gelchromatographie an Sephadex G100 in 1 M Ameisensäure

Material: 2 mg (50 nMol) natives Akrosin,
gelöst in 200 μ l Elutionspuffer
Säulendimensionen: 1 x 130 cm
Totalvolumen: 95 ml
Durchflußgeschwind.: 3 ml/h

Die Pools sind durch unterbrochene Linien gekennzeichnet und mit römischen Zahlen bezeichnet.

Bemerkungen zur Gelfiltration

Die Elutionsausbeute wurde durch quantitative Aminosäureanalyse und durch Berechnung der Extinktion bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ überprüft. Dabei wurde ein Proteinverlust von 50% nach der Gelfiltration in 1 M Ameisensäure festgestellt. Dieses Resultat ist nicht verwunderlich, da Akrosin als peripheres Membranprotein hydrophobe Bindungsstellen für Amphiphile besitzt und somit an hydrophobe Oberflächen wie Gelmatrizes bindet (s. B.5.3.2.). Auf Grund dieser Eigenschaft wurden, um größeren Proteinverlust zu vermeiden, bei weiteren Gelfiltrationen dem Elutionspuffer Harnstoff oder Detergentien zugesetzt. Der geringste Proteinverlust war beim Arbeiten in Harnstofflösung zu verzeichnen (s. Tab.3).

D.2.1.2. Gelfiltration an Sephadex G100 unter denaturierenden Bedingungen

Um eine eventuelle Assoziation der zwei Ketten durch hydrophobe Wechselwirkungen festzustellen, wurde die in D.2.1.1. beschriebene Sephadex G100-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, wobei dem Elutionspuffer Harnstoff oder Detergens zugesetzt wurde.

In einem weiteren Versuch wurde vor der Sephadex G100-Chromatographie eine Denaturierung des Ausgangsmaterials durch kurzzeitiges Kochen des Ausgangsmaterials in einer ameisen-sauren 7 M Harnstofflösung vorgenommen. In Tabelle 3 sind die jeweiligen Versuchsbedingungen angegeben.

Die Elutionsprofile aller Chromatographien entsprachen in etwa dem in Abbildung 10 dargestellten Verlauf und werden daher nicht extra angegeben. Die Ausbeuten konnten um 30 bis 50% verbessert werden.

Die proteinhaltige Fraktion wurde analog D.2.1.1. in 3 Teilen gepoolt und entweder durch wiederholte Ultrazentrifugation in einer Amiconzelle (Membran YM 5) oder durch Gelfiltration an Sephadex

Tab.3 Versuche zur Kettentrennung ohne vorherige Reduktion

Vorbehandlung	Isolierungsschritt	Elutionsmittel	Ausbeute	Kettentrennung
-	Gelfiltration an Sephadex G100	1 M HCOOH	50%	nein
-	Gelfiltration an Sephadex G100	1 M HCOOH/ 0,1% SDS	65%	nein
-	Gelfiltration an Sephadex G100	1 M HCOOH/ 0,1% Brij 35	65%	nein
-	Gelfiltration an Sephadex G100	1 M HCOOH/ 0,1% Triton X-100	70%	nein
Kochen in 1 M HCOOH/7 M Urea	Gelfiltration an Sephadex G100	1 M HCOOH/ 7 M Urea	75%	nein
Lösen in 6M-Guanidin-HCl/1 M HCOOH	HPLC an einer "reversed-phase"-Säule	0,1% TFA Acetonitril-Gradient	40%	nein

G10 in ameisensaurer Lösung entsalzt. Eine N-terminale Sequenzanalyse ergab, daß in keinem Fall eine Kettentrennung möglich war.

D.2.1.3. Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer "reversed-phase"-Säule

Durch die zunehmende Bedeutung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie in der Protein- und Peptidchemie eröffneten sich neue Möglichkeiten zur Trennung und Analytik von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren.

Das Verfahren der Hochdruckflüssigkeitschromatographie gilt als ausgezeichnete Alternative zu den konventionellen Trenntechniken indem sie schnelle, empfindliche und hochauflösende Trennungen von Proteinen und Peptidgemischen ermöglicht. Eine Trennung an einer "reversed-phase"-Säule, die gemäß der Hydrophobizität der zu trennenden Komponenten erfolgt, sollte also eine durch hydrophobe Wechselwirkungen bedingte Assoziation der beiden Ketten im Akrosinmolekül separieren. Das Füllmaterial der "reversed-phase"-Säulen besteht aus mikroporösen Partikeln auf Silikagel-Basis, an deren Oberfläche unpolare Alkyl-Seitenketten kovalent gebunden sind. Die Trennung erfolgt durch unterschiedliche Konzentrationen organischer Elutionsmittel, welche polarer sind als die stationäre Phase. Dieses Prinzip verhält sich "reversed" zu den konventionellen Methoden, bei denen die stationäre Phase den höher polaren Partner darstellt.

In Abbildung 11 ist das Elutionsprofil dargestellt. Der zu den Elutionszeiten 40,18 bis 40,67 eluierte Peak zeigte in einer N-terminalen Sequenzanalyse die bekannten 2 Sequenzen des Ausgangsmaterials. Alle weiteren Peaks wurden durch Aminosäureanalyse untersucht und zeigten neben Reagentien und Salzen kein Proteinmaterial.



Abb.11 Hochdruckflüssigkeitschromatographie von nativem Akrosin an einer "reversed-phase"-Säule Vydac TPRP 10 (s. C.3.3.1.)

Probe: 0,5 mg (12,5 nMol) natives Akrosin gelöst
in 200 µl 6 M Guanidin/HCl, 1 M HCOOH

Durchflußge-
schwindigkeit: 1,5 ml/min

Detektion: 210 nm (0,025 AUFS)

Gradient: 5 - 70% Acetonitril

Auch in diesem System war keine Trennung der Ketten möglich, was gegen eine auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhende Assoziation der beiden Komponenten des Akrosinmoleküls spricht.

D.2.2. Trennung der Ketten nach reduktiver Spaltung der Disulfidbrücken

D.2.2.1. Reduktion und Carboxymethylierung

Nachdem durch die in den letzten Kapiteln beschriebenen Versuche keine Separierung der zwei Komponenten erzielt werden konnte, wurde eine kovalente Verknüpfung über eine Disulfidbrücke vermutet. Es wurde daher eine Spaltung der Schwefelbrücken mit Mercaptoäthanol und anschließend eine Carboxymethylierung der entstandenen Halbcysteine durchgeführt (s. C.3.1.1. und C.3.1.2.).

D.2.2.2. Auftrennung durch Gelfiltration

Durch Gelfiltration über Sephadex G100 wurde eine Auftrennung des S-carboxymethylierten Gemisches in mehrere Komponenten erzielt. Der Verlauf der Chromatographie ist in Abbildung 12 wiedergegeben.

D.2.2.2.1. Charakterisierung der Komponenten

Aminosäureanalyse:

Die Aminosäureanalyse zeigte nach der Entsalzung für die Fraktionen A, B, C₁, C₂, D und F aus Abbildung 12 genügend Proteinmaterial für weitere Untersuchungen an. Pool E enthielt sehr wenig

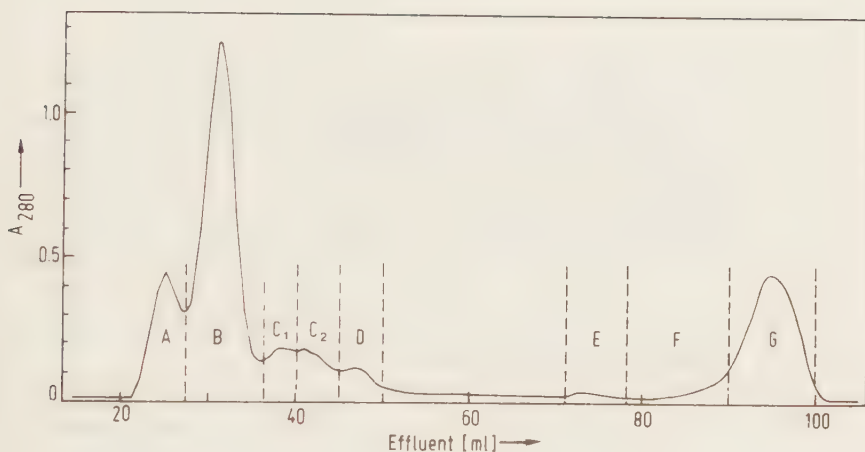


Abb.12 Gelchromatographie an Sephadex G100 in 7 M Harnstoff/
1 M Ameisensäure

Material:	8 mg (200 nMol) S-carboxymethy- liertes Ausgangsmaterial
Säulendimensionen:	1 x 130 cm
Totalvolumen:	95 ml
Durchflußgeschwind.:	3 ml/h

Die Pools sind durch unterbrochene Linien gekennzeichnet
und mit Buchstaben von A bis G bezeichnet.

Proteinmaterial. In Pool G waren neben Reagenzien und Salzen keine nennenswerten Anteile an Aminosäuren enthalten.

SDS-Gelelektrophorese:

Die Untersuchung der Molekülgrößen des in den Fraktionen A, B, C₁, C₂, D und F aus Abbildung 12 enthaltenen Materials erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese. Durch den Vergleich mit einer Anzahl von Eichproteinen wurden die Molekulargewichte abgeschätzt. Das in Fraktion B enthaltene Material zeigte in der Elektrophorese eine einzige Bande mit gleichem MG wie das Ausgangsmaterial (s. Abb.13).

Jegliches Fehlen weiterer Banden deutete bereits auf eine hohe Reinheit des in diesem Pool enthaltenen Materials hin.

Eine Abschätzung der Molekulargewichte der in den Fraktionen A, C₁, C₂, D und F der Gelfiltration erhaltenen Komponenten ergab für das Material beim Ausschlußvolumen der Säule Molekulargewichte von 70 000 bis 90 000, für das Material C₁ ein MG von 28 000, für Pool C₂ ein MG von 18 000, für Pool D ein MG von 15 000. Das Material von Pool F zeigte keine Bande in der Gelelektrophorese (s. Abb.14).

Endgruppenbestimmung der Komponenten:

Durch Ansequenzieren der in Abbildung 12 abgebildeten Pools A, B, C₁, C₂, D und F konnten die zwei im Ausgangsmaterial enthaltenen Sequenzen getrennt in Pool B und F identifiziert werden. Während das in Pool B enthaltene Proteinmaterial nur eine Sequenz in großer Reinheit zeigt, wurden in Pool F neben der gesuchten zweiten Sequenz noch weitere Aminosäuren in jedem Abbauschritt gefunden, was eine weitere Reinigung dieses Peptidgemisches erforderte. Die Aufarbeitung dieses Pools wird in D.4.1. beschrieben.

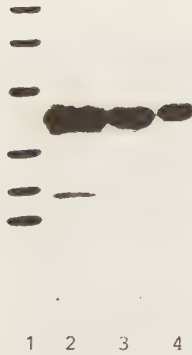


Abb.13 SDS-Elektrophorese (s. C.3.4.2.)

- 1 Referenzproteine I
- 2 Ausgangsmaterial
- 3 Ausgangsmaterial reduziert
- 4 Pool B (s. Abb.12)

Das unterschiedliche Elutionsverhalten der beiden Komponenten in der Sephadex G100-Chromatographie ließ auf ein wesentlich kleineres MG der zweiten Polypeptidkette schließen. Auf Grund dieses Größenunterschiedes werden die beiden Komponenten im Folgenden als schwere und leichte Kette bezeichnet. In Abbildung 15 und 16 sind jeweils 4 Schritte der N-terminalen Sequenzen von S-carboxymethylierter schwerer und leichter Kette angegeben.

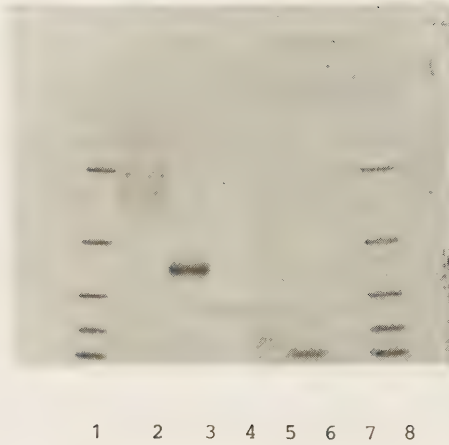


Abb.14 SDS-Gelelektrophorese der Pools aus Abb.12
(s. C.3.4.3.)

- | | |
|---------|---------------------|
| 1 und 8 | Referenzproteine I |
| 2 | Pool A |
| 3 | Pool B |
| 4 | Pool C ₁ |
| 5 | Pool C ₂ |
| 6 | Pool D ₂ |
| 7 | Pool F |

Val - Val - Gly - Gly -

Abb.15 N-terminale Sequenz der schweren Kette

Arg - Asp - X - Ala -

Abb.16 N-terminale Sequenz der leichten Kette

Die höhermolekularen Komponenten aus Pool A wurden als aggregiertes Material interpretiert, da die Aggregationsneigung des hydrophoben Ausgangsmaterials bekannt ist (s. B.5.3.2.). Die Sequenzanalyse bestätigte mit N-terminalem Val-Val-Gly-Gly- diese Vermutung.

Das Auftreten von Komponenten mit niedrigerem MG als 40 000 ließ vermuten, daß es sich dabei um autoproteolytische Abbauprodukte handelt, da Akrosin als Protease die Fähigkeit zur Autodigestion besitzt.

Die weitere Identifizierung dieser Komponenten anhand der Ergebnisse der Sequenzanalyse wird in D.3.4.2. beschrieben.

D.2.2.3. Auftrennung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Ein zweiter Ansatz des in D.2.2.1. und D.2.2.2. beschriebenen S-carboxymethylierten Gemisches wurde durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer grobporigen "reversed-phase"-Säule aufgetrennt (s. C.3.3.1.). Der Verlauf der Chromatographie ist in Abbildung 17 wiedergegeben.

D.2.2.3.1. Charakterisierung der erhaltenen Komponenten

Aminosäureanalyse:

Die Aminosäureanalyse zeigte für die bei den Retentionszeiten 21,88, 23,96 und 47,33 bis 47,95 eluierten Peaks Proteinmaterial in für weitere Untersuchungen ausreichender Menge an. Die Aminosäureanalysen der bei den Retentionszeiten 21,88 und 23,96 eluierten Peaks waren identisch.

SDS-Gelelektrophorese:

Das bei der Retentionszeit 47,33 bis 47,95 eluierte Material zeigte in der SDS-Gelelektrophorese eine einzige Bande mit gleichem MG wie das Ausgangsmaterial (s. Abb.18).

Das zu den Retentionszeiten 21,88 und 23,96 eluierte Proteinmaterial zeigte bei Einsatz einer aliquoten Menge in die SDS-Gelelektrophorese keine Proteinbande. Eine Erklärung dafür wird in Kapitel D.4.6. dargestellt.

Endgruppenbestimmung:

Durch Ansequenzieren der bei den Retentionszeiten 21,88, 23,96 und 47,33 bis 47,95 eluierten Peaks konnten die zwei im Ausgangsmaterial enthaltenen Sequenzen getrennt identifiziert werden. Das bei den Retentionszeiten 47,33 bis 47,95 eluierte Probenmaterial zeigte die in Abbildung 15 angegebene N-terminale Sequenz

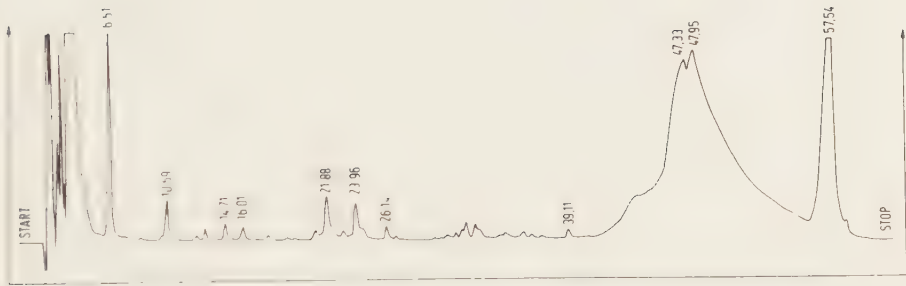


Abb.17 Hochdruckflüssigkeitschromatographie von S-carboxymethyliertem Akrosin an einer "reversed-phase"-Säule Vydac TPRP 10 (s. C.3.3.1.)

Probe:	0,5 mg (12,5 nMol) S-carboxymethyliertes Akrosin in 200 μ l Mercaptolysepuffer
Durchflußgeschwindigk.:	1,5 ml/min
Detektion:	210 nm (0,025 AUFS)
Gradient:	5 bis 70% Acetonitril

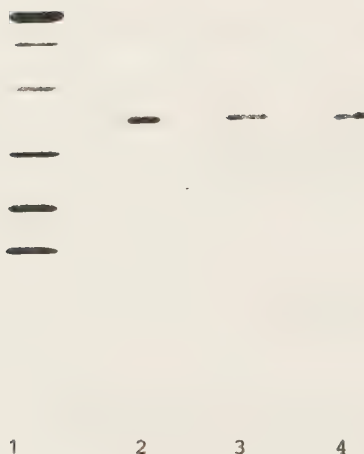


Abb.18 SDS-Elektrophorese (s. C.3.4.2.)

- 1 Referenzproteine I
- 2 Ausgangsmaterial
- 3 Ausgangsmaterial reduziert
- 4 Zur Retentionszeit 47,33 bis 47,95
eluiertes Material (s. Abb.17)

der schweren Kette in großer Reinheit, das bei den Retentionszeiten 21,88 und 23,96 eluierte Proteinmaterial war N-terminal identisch und zeigte die in Abb.16 angegebene Sequenz der leichten Kette.

Das unterschiedliche Elutionsverhalten der beiden Komponenten in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer "reversed-phase"-Säule ließ auf eine wesentlich höhere Hydrophobizität der schweren Kette schließen.

D.2.3. Zusammenfassung

In den bisherigen Abschnitten des Kapitels D.2. wurde dargelegt, daß sich Eberakrosin nur nach reduktiver Spaltung der Disulfidbrücken in die zwei Komponenten des Ausgangsmaterials auftrennen läßt, was eine kovalente Bindung der zwei Polypeptidketten vermuten läßt und somit beide Komponenten als dem Akrosinmolekül zugehörig charakterisiert. Entsprechend ihrer Elutionsreihenfolge in der Gelfiltration wurden die beiden Komponenten als schwere und leichte Kette bezeichnet. Die Elutionsreihenfolge in der Hochdruckflüssigkeitschromatographie zeigte eine unterschiedliche Hydrophobizität der beiden Ketten an.

Im Zuge der Kettentrennung erfolgte bei der Sephadex G100-Chromatographie eine Auftrennung in weitere Komponenten, die als aggregiertes bzw. durch autoproteolytischen Abbau entstandenes Proteinmaterial interpretiert wurden. Diese werden in späteren Kapiteln näher charakterisiert.

D.3. Charakterisierung der schweren Kette

D.3.1. Aminosäurezusammensetzung

In Tabelle 4 ist die Aminosäurezusammensetzung der schweren Kette angegeben und daneben zum Vergleich diejenige des aus schwerer und leichter Kette bestehenden Ausgangsmaterials. Die beiden Analysen zeigen keine sehr großen Unterschiede. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da die in D.2. erhaltenen Resultate für eine kleine Molekülgröße der leichten Kette sprechen, deren Abtrennung

Tab.4 Aminosäurezusammensetzung der schweren Kette

Amino- säure	R e s t e		
	schwere (a)	Kette (b)	natives Akrosin (b)
Asp	23,2	23	25
Thr	19,4	19	20
Ser	17,5	17	18
Glu	26,5	26	27
Pro	36,4	36	37
Gly	32,4	32	34
Ala	19,2	19	20
Cys	6,3	6	8
Val	26,8	27 ⁺	27 ⁺
Met	6,1	6	6
Ile	17,1	17	17
Leu	24,2	24	25
Tyr	9,6	10	10
Phe	9,5	9	11
Lys	15,4	15	16
His	6,7	7	7
Arg	23,4	23	27
Trp	n.b.	7,5 ⁺⁺	7,5 ⁺⁺
GlcNac	0	0	5
Total		321	340

⁺ Wert nach 72 h Hydrolyse
⁺⁺ aus der Sequenzanalyse
a berechnete Aminosäure/Mol Protein
b ganzzahlige Werte
n.b. nicht bestimmt

vom Ausgangsmaterial nur eine geringfügige Molekulargewichts- und Aminosäuredifferenz bewirken dürfte.

D.3.2. Zuckeranalyse

Überraschenderweise zeigte die Zuckeranalyse kein Kohlehydrat für die separierte schwere Kette, so daß der im Ausgangsmaterial festgestellte Kohlehydratanteil (s. D.1.3.) in seiner Gesamtheit der leichten Kette zugerechnet werden muß.

D.3.3. N-terminale Aminosäuresequenz

In einem automatisierten Sequenatorlauf konnte für die in D.2.2. isolierte reine schwere Kette die Sequenz von 52 Schritten ermittelt werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 wiedergegeben. Die Bezifferung einzelner Aminosäurereste gibt den jeweiligen Sequenzierungsschritt an.

Die Information aus dieser N-terminalen Teilsequenz war für die weitere Strategie der Sequenzierung insofern nützlich, als die Position von drei der insgesamt sechs durch Aminosäureanalyse bestimmten Methionine fixiert worden war. Da diese drei Methionine bereits in den ersten 22 Aminosäuren des N-terminalen Bereiches enthalten sind, ließ eine günstige Verteilung der restlichen drei Methionine im Molekül nach der Fragmentierung durch Bromcyan wenige große Bruchstücke erwarten, die für den automatischen Edman-Abbau besonders geeignet sind.

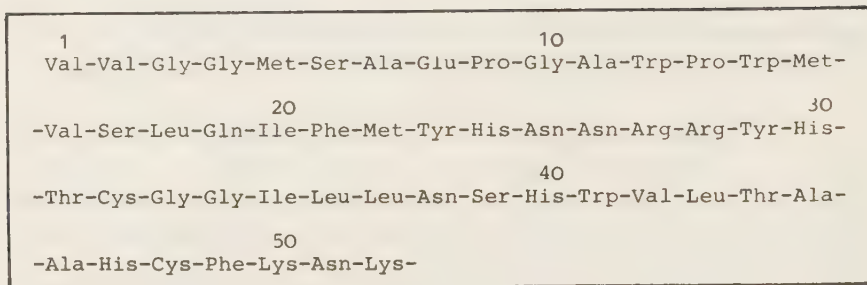


Abb.19 N-terminale Sequenz der schweren Kette

Bemerkungen zur Sequenzanalyse:

Alle Sequenzierungsläufe erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. F. Lottspeich. Die Analysen wurden an einem automatischen "liquid phase" Sequenator durchgeführt, einem Prototyp nach der Version von Edman und Begg (1967).

Die Weiterentwicklung der Identifizierungsmethoden erlaubt bereits Sequenzbestimmungen ab einer Proteinkonzentration von 1 nMol. (Zum Vergleich: Als Edman (1949) zum ersten Mal seine Sequenzierungsmethode beschrieb, sprach er von "Mikrosequenzierung", da er zu einer Zeit, in der üblicherweise Gramm-Mengen zur Bestimmung einer einzigen Aminosäure benötigt wurden, bereits mit ca. 100 Mikromol Protein Sequenzierungen durchführte.)

Die Zahl der möglichen Sequenzierungsschritte hängt von einer möglichst kompletten Reaktion im Sequenator ab. Eine Sequenatorausbeute von 98% erlaubt die eindeutige Identifizierung von ca.

60 Aminosäureresten pro Sequenatorlauf, wohingegen bei einer Ausbeute von 90% dieses Ergebnis drastisch auf kaum mehr als 10 mögliche Sequenzierungsschritte reduziert wird, da die Identifizierung der PTH-Aminosäuren gegen einen auf Grund unspezifischer und inkompletter Spaltungen auftretenden Hintergrund nicht mehr eindeutig möglich ist. In Tabelle 5 wird die Zahl der möglichen eindeutigen Sequenzierungsschritte veranschaulicht, berechnet für Sequenatorausbeuten von 99%, 95% und 90% (nach Croft, 1980).

Auf Grund des anormalen Verhaltens von Prolinresten beim Phenylisothiocyanat-Abbau wurde, wenn diese Aminosäure auf Grund vorausgegangener Sequenatorläufe zu erwarten war, die Spaltungszeit (Programmpunkt: "cleavage") verlängert (Brandt et al., 1976).

Die Sequenzierung von Peptiden erfolgte unter Zusatz von Polybren (Tarr et al., 1978), das als kationischer Träger die Auswaschung kürzerer Peptide durch die Lösungsmittel während des sequentiellen Abbauprogramms zurückdrängt.

Tab.5 Prozentuale Ausbeute nach n Schritten im automatischen Sequenatorlauf bei Sequenatorausbeuten von 99%, 95% und 90%

n	Sequenatorausbeute		
	99%	95%	90%
10	90	60	35
50	60	8	0,5
100	36	0,6	0,003

Die Identifizierung und quantitative Auswertung der PTH-Aminosäuren erfolgte durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (s. C.3.3.3.) (Lottspeich 1980). Dieses Verfahren ist wesentlich empfindlicher und schneller als die traditionellen Methoden (Dünnschichtchromatographie, Gaschromatographie u.a.) und ermöglicht den Nachweis von PTH-Aminosäuren ab einer Konzentration von 5 pMol.

D.3.4. Autoproteolyse

Viele Beispiele von enzymatischen Autolysen sind in der Literatur beschrieben, wobei man allgemein annimmt, daß der autoproteolytische Angriff immer auf flexible Regionen oder auf sog. "Oberflächenloops" im nativen Molekül gerichtet ist.

Nach Linderstrøm-Lang (1952) werden dabei nur Peptidbindungen angegriffen, die nicht über Wasserstoffbrückenbindungen gebunden sind.

D.3.4.1. Nachweis der Autolyse beim Akrosin

Das Auftreten von zusätzlichen Komponenten mit niedrigerem MG als 40 000 bei der Kettentrennung auf Sephadex G100 (s. D.2.2.2.) ließ vermuten, daß es sich dabei um autoproteolytische Abbauprodukte handelt, da Akrosin als Protease die Fähigkeit zur Autodigestion besitzt.

Diese Interpretation wurde durch folgende Versuche bestätigt.

DFP-Inaktivierung:

Eine starke Überladung eines 10%igen Polyacrylamidgeles (s. C.3.4.1.) mit reduziertem Ausgangsmaterial zeigte neben der Hauptbande bei MG 40 000 ein zusätzliches Bandenmuster, das mit dem für die Nebekomponenten der Kettentrennung übereinstimmt (s. Abb.14 und Abb.20).

Diese zusätzlichen Banden erscheinen nicht, wenn das Ausgangsmaterial vor der Gelelektrophorese mit DFP inaktiviert wird (s. C.3.1.3. und Abb.20).

Autoradiographie:

Um zu beweisen, daß es sich bei den in Abb.20 zusätzlich zur Hauptbande auftretenden Banden um Bestandteile des Akrosinmoleküls handelt, wurde Akrosin mit radioaktiv markiertem (1,3-¹⁴C)-DFP inaktiviert (s. C.3.1.4.). Anschließend wurde eine Gelelektrophorese unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die erhaltenen Banden wurden nach Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R250 durch Autoradiographie (s. C.3.4.3.) detektiert und in einem Scanner vermessen (s. Abb.21 und 22). Nach der Coomassie Brilliant Blue-Färbung waren analog Abb.20 neben der Hauptbande keine zusätzlichen Banden in der Gelelektrophorese des (1,3-¹⁴C)-DFP-inaktivierten Ausgangsmaterials sichtbar. Durch die wesentlich empfindlichere Detektion durch Autoradiographie wurde neben der Hauptkomponente noch das zusätzliche bekannte Bandenmuster der niedermolekularen Komponente sichtbar (s. Abb.21). Da in all diesen zusätzlichen Komponenten radioaktiv markiertes DFP eingebaut wurde, handelt es sich dabei offensichtlich um autoproteolytische Abbauprodukte, die bereits vor der kompletten Inaktivierung mit DFP entstanden sind.

Ein erheblicher Proteinanteil konnte nicht in das 10%ige Polyacrylamidgel penetrieren und blieb als aggregiertes Material am Start hängen.

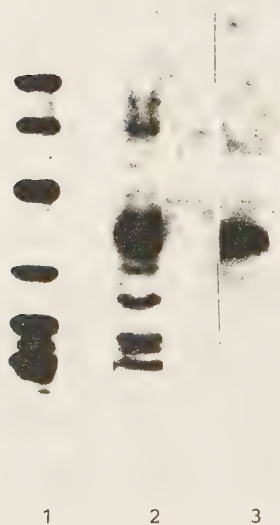


Abb.20 SDS-Elektrophorese

- 1 Referenzproteine I
- 2 Ausgangsmaterial, reduziert
- 3 Ausgangsmaterial, DFP-inaktiviert, reduziert



Abb.21 SDS-Elektrophorese (s. C.3.4.1.)
mit anschließender Autoradiographie

IIIa (1,3-¹⁴C)DFP-Akrosin
nicht reduziert

IIIb (1,3-¹⁴C)DFP-Akrosin
reduziert

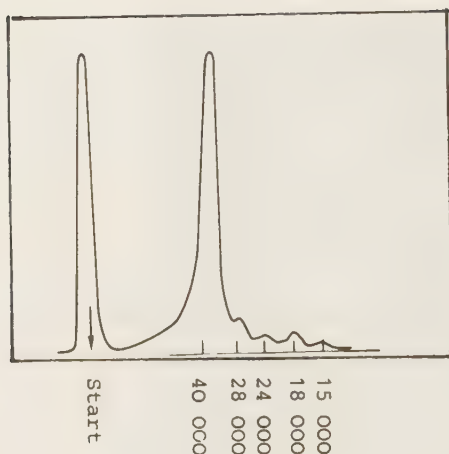


Abb.22 Quantitative Bestimmung der
Komponenten aus Abb.21

Durch diese Untersuchungen wurde bestätigt, daß die niedermolekularen Komponenten Bestandteile des Akrosinmoleküls darstellen, die durch Autolyse gebildet wurden.

D.3.4.2. N-terminale Charakterisierung der bei der Kettentrennung erhaltenen Nebenkomponten

Im vorherigen Kapitel wurden die bei der Kettentrennung durch Sephadex G100-Chromatographie erhaltenen zusätzlichen Komponenten als autoproteolytische Bruchstücke charakterisiert. Die Identifizierung dieser Komponenten, wie sie in den Fraktionen

C₁, C₂ und D bei der Gelfiltration des reduzierten, carboxymethylierten Akrosins erhalten worden waren (s. Abb.12), konnte erst anhand der Ergebnisse der Sequenzanalyse durchgeführt werden.

Der Pool C₁:

Dieses Bruchstück mit MG 28 000 zeigte in einer N-terminalen Sequenzanalyse von einigen Schritten die bekannte N-terminale Sequenz Val-Val-Gly-Gly- der schweren Kette, was auf eine Verkürzung des Moleküls durch Autoproteolyse im C-terminalen Bereich schließen läßt.

Der Pool C₂:

Im N-terminalen Abbau ließen sich keine PTH-Aminosäuren nachweisen. Da die Aminosäureanalyse der in diesem Pool enthaltenen Komponente mit MG 18 000 Proteinmaterial anzeigte, mußte angenommen werden, daß ein blockierter N-Terminus vorliegt. Eine mögliche Zyklisierung eines N-terminalen Glutamins zu Pyroglutamat sollte durch die Behandlung mit Pyroglutamataminopeptidase nach Podell und Abraham (1978) aufgehoben werden (s. C.3.9. 2.5.). Ein nach dieser Behandlung durchgeführter automatischer Edman-Abbau war jedoch nicht erfolgreich.

Der Pool D:

Diese Komponente mit MG 15 000 war N-terminal homogen und wurde im Sequenator 39 Schritte abgebaut. In Abbildung 23 ist die erhaltene Sequenz angegeben.

Da die Summe der Molekulargewichte des in Pool C₁ enthaltenen aminoenständigen Bruchstückes mit MG 28 000 und die in Pool D enthaltenen Komponente mit MG 15 000 in etwa das MG der schweren Kette ergibt, liegt die Vermutung nahe, daß diese beiden Komponenten die einander entsprechenden N- und C-terminalen autoproteolytischen Bruchstücke darstellen.

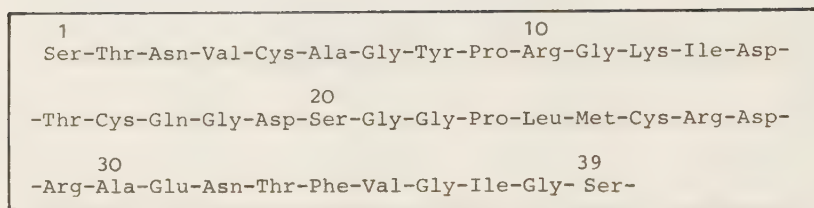


Abb.23 Sequenz des Pools D

D.3.4.3. Limitierte Autoproteolyse

Die in den letzten Kapiteln erhaltenen Informationen bestätigten, daß natives Akrosin unter geeigneten Bedingungen offensichtlich bestimmte, besonders exponierte Peptidbindungen im eigenen Molekül hydrolysiert. Diese Eigenschaft wurde im Folgenden ausgenutzt beim limitierten proteolytischen Abbau.

D.3.4.3.1. Vorversuche im analytischen Maßstab

Da für diese Art der Spaltung keine generell anwendbaren Reaktionsbedingungen aufgestellt werden können, wurden Vorversuche im analytischen Maßstab durchgeführt, um geeignete Spaltbedingungen zu eruieren.

Getestet wurde das Proteolyseverhalten in Abhängigkeit der Faktoren Reaktionszeit, pH, Ionenstärke, Temperatur und Denaturierung. In Abbildung 24 ist das Ergebnis einer Inkubation in einer 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung, pH 8,0, 37°C ohne Denaturierung bei unterschiedlicher Inkubationsdauer dargestellt (s. C.3.9.2.1.).

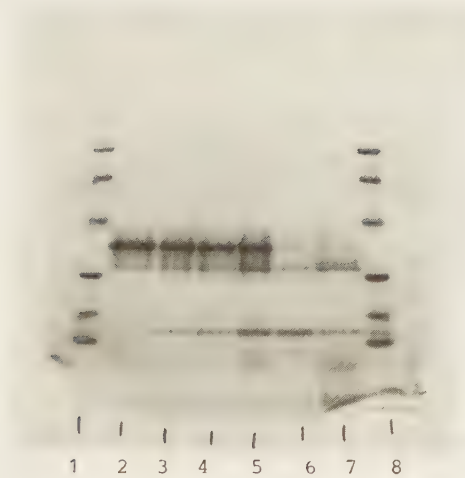


Abb.24 SDS-Gelelektrophorese (s. C.3.4.2.)
Vorversuch zur Autoproteolyse
Akrosindigestion pH 8,0, 37°C

1 und 8	Referenzproteine I
2	Autoproteolyse nach 0 h
3	Autoproteolyse nach 2 h
4	Autoproteolyse nach 4 h
5	Autoproteolyse nach 12 h
6	Autoproteolyse nach 22 h
7	Autoproteolyse nach 48 h

Unter den gewählten Bedingungen erschien uns eine Reaktionszeit zwischen 12 und 22 Stunden für einen Ansatz im präparativen Maßstab als günstig.

D.3.4.3.2. Präparative Durchführung

Unter den in D.3.4.3.1. als geeignet ermittelten Bedingungen wurde ein Inkubationsansatz mit 75 nMol nativem Enzym durchgeführt. Nach 20-stündiger Autoproteolyse wurde die Reaktion gestoppt, der Ansatz mercaptolysiert und anschließend S-carboxymethyliert.

D.3.4.3.3. Isolierung der autoproteolytischen Fragmente

Eine erste Auftrennung des Inkubationsansatzes wurde durch Gel-filtration an Sephadex G100 erreicht. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 25 wiedergegeben. Die Bezeichnung der einzelnen Pools erfolgte auf Grund ihrer Elutionsreihenfolge mit A_I bis A_V . Der letzte Gipfel beim Totalvolumen der Säule enthielt nur Salz und Reagentien.

D.3.4.3.4. Charakterisierung der Pools der Gelchromatographie an Sephadex G100

Nach der Entsalzung wurde die Reinheit der isolierten Komponenten an Hand der SDS-Gelelektrophorese, Aminosäureanalyse und N-terminalen Sequenzanalyse überprüft.

Der Pool A_I :

Dieser Pool enthielt autoproteolytische nicht hydrolysierte schwere Kette. Die Proteinbande in der SDS-Gelelektrophorese und die N-terminale Sequenzanalyse stimmten mit den Daten der schweren Kette überein.

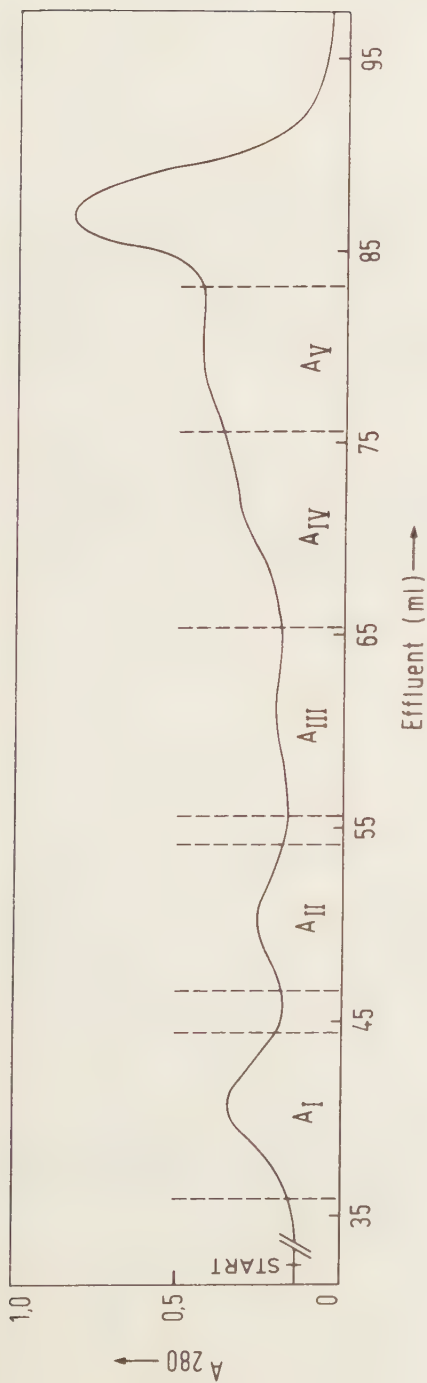


Abb. 25 Gelchromatographie an Sephadex G100 in 7M Harnstoff/1 M Ameisensäure

Material: 3 mg (75 nMol) autoproteolytisch gespaltenes, reduziertes, carb-oxymethyliertes Akrosin

Säulendimen-
sionen: 1 x 130 cm
Totalvolumen: 95 ml
Durchflußgeschw.: 3 ml/h

Die Pools sind durch unterbrochene Linien gekennzeichnet und mit A_I bis A_V be-
zeichnet.

Der Pool A_{II}:

In der SDS-Gelelektrophorese zeigte das Material dieses Pools eine Proteinbande vom MG 18 000. Im N-Terminalabbau ließ sich keine endständige PTH-Aminosäure identifizieren; es darf angenommen werden, daß in diesem Pool das gleiche N-terminal blockierte Bruchstück wie in Pool C₂ aus D.3.4.2. enthalten ist, da auch die Aminosäureanalyse identisch ist.

Der Pool A_{III}:

Dieser Pool zeigte eine geringe UV-Absorption. Die SDS-Gelelektrophorese ergab eine Proteinbande bei MG ca. 8 000, die Aminosäureanalyse zeigte genügend Material, um eine Sequenzanalyse durchzuführen. In Abbildung 26 ist die erhaltene Sequenz angegeben.

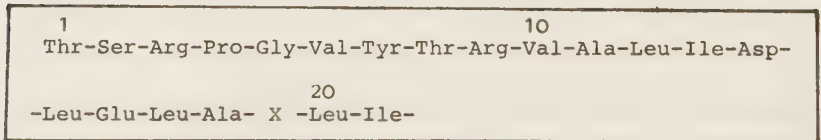


Abb.26 Sequenz des Pools A_{III}

Pool A_{IV} und A_V:

In diesen beiden Pools waren unreine Peptide bzw. Peptidgemische enthalten, die durch Rechromatographie in einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigt wurden.

D.3.4.3.5. Weitere Auftrennung des Peptidgemisches aus Pool A_{IV} und A_V

Unter Anwendung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurden die in diesem Pool enthaltenen Peptide weiter aufgetrennt (s. C.3.3.2. und Abb.27). Die Reinheit der erhaltenen Peaks wurde durch Aminosäureanalyse überprüft und geeignete Peaks N-terminal sequenziert. Unreine Peaks wurden in einer zweiten Hochdruckflüssigkeitschromatographie in einem geeigneten Gradientensystem weiter gereinigt.

Auf Grund der begrenzten Sequenatorkapazität konnten bisher noch nicht alle Peptide N-terminal analysiert werden. In Tabelle 6 und 7 sind die Sequenzen der bisher charakterisierten Peptide angegeben.

Die Startpeaks, die unmittelbar nach der Injektion des Peptidgemisches auf die Säule erschienen, enthielten einzelne Aminosäuren und Salze.

D.3.5. Bromcyanspaltung

Auf Grund der in D.3.3. angestellten Überlegungen bot sich für die weitere Fragmentierung der schweren Kette die sehr spezifische chemische Spaltung an den Methioninen mit Bromcyan an. Dem durch Aminosäureanalyse ermittelten Gehalt von 6 Methioninen zufolge wurden 7 Bromcyanfragmente nach der Spaltung erwartet.

Zur Spaltung wurde sowohl S-carboxymethylierte schwere Kette als auch natives Akrosin eingesetzt.

Der Verlauf der Spaltung wurde durch Aminosäureanalyse kontrolliert, wobei die Umwandlung der Aminosäure Methionin zu Homoserin als Parameter diente.

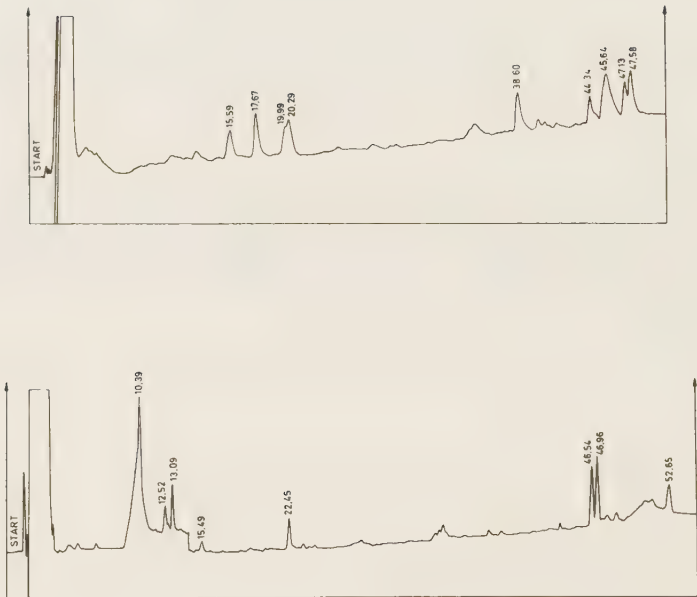


Abb.27 Hochdruckflüssigkeitschromatographie von Pool A_{IV} (oben) und Pool A_V (unten) an einer reversed-phase RP-18-Säule

Probe:	ein Drittel des jeweiligen Pools
Auftragsvolumen:	200 µl
Durchflußgeschw.:	1,5 ml/min
Detektion:	210 nm (0,025 AUFS)
Gradient:	2,5 bis 40% Acetonitril (s. C.3.3.2.)

Tab.6 Peptide, die durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie aus Pool A_{IV} separiert wurden

Retentions- zeit	
15,59	¹ Ile-Asp-Thr-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro- ¹⁰ Leu-Met-Cys-Arg ¹⁵
17,67	¹ Thr-Ser-Pro-Thr-Leu-Gln-Glu-Ala-Arg ⁹
38,60	¹ Phe-Val-Glu-Glu-Ile-Ile-Ile-His-Glu-Gly-Lys ¹⁰
45.64	¹ Tyr-Thr-Phe-Pro-Gly- ⁵

Tab.7 Peptide, die durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie aus Pool A_V separiert wurden

Retentions- zeit	
22,45	¹ Pro-Val-Lys-Pro-Pro-Leu-Gln-Glu-Arg ⁹
46,54	¹ Ala-Pro-Gln-Thr-Asp- X -Ile- X -Gly-Thr- ¹⁰
46,96	¹ Ile-Thr-Pro-Pro-Val-Pro-Pro-Gly-Pro-Phe-Ile- ¹¹
52,65	¹ Leu-Ile-Phe-Gly-Ala-Asn-Glu-Val-Val-Pro-Gly- ¹⁰ Ser-Asn-Lys-Pro-Val-Lys ¹⁷

Da bekannt ist, daß bereits bei der Inkubation in 70%iger Ameisensäure, die als Lösungsmittel bei der Bromcyan-spaltung verwendet wird, die Spaltung besonders säurelabiler Peptidbindungen wie z.B. der Asp-Pro-Bindung eintritt (Fowler und Zabin, 1978), wurden SDS-Elektrophoresen S-carboxymethylierter schwerer Kette vor und nach 20-stündiger Inkubation in 70%iger Ameisensäure durchgeführt. Es zeigte sich jedoch kein Einfluß der Säurebehandlung auf das elektrophoretische Verhalten der schweren Kette.

Nachdem eine erste Inkubation mit Bromcyan unter den von Gross und Witkop (1961) beschriebenen Bedingungen nur einen Gehalt von ca. 20% Homoserin in der Aminosäureanalyse zeigte, wurden weitere Versuche unter modifizierten Reaktionsbedingungen durchgeführt (s. Tab.8).

Ein Inkubationsansatz wurde in wässriger Trifluoressigsäure durchgeführt, da bekannt ist, daß eine Methionyl-Threonin- oder eine Methionyl-Serin-Bindung in der Sequenz eine komplette Spaltung durch Bromcyan verhindert durch eine intermediäre Umlagerung dieser benachbarten Aminosäuren zu Homoserinlaktone ohne nachfolgende Spaltung. Ein Wechsel des Lösungsmittels zu 70%iger Trifluoressigsäure wird in diesem Fall von Schroeder et al. (1969) empfohlen. Bei Akrosin ist eine Kombination von Met-Ser in Position 5 und 6 des N-Terminus bekannt.

Da Bromcyan nicht an Methioninen spaltet, die als Sulfoxide vorliegen, wurde vor der Spaltung eine Reduktion mit 2-Mercapto-Äthanol im alkalischen Medium durchgeführt (Neumann 1972). Weiterhin wird in der Literatur beschrieben, daß die nach Alkylierungsreaktionen häufig entstandenen Methylsulfoniumsalze resistent gegen eine Spaltung mit Bromcyan sind. Deshalb wurde bei einem Spaltversuch mit S-carboxymethylierter schwerer Kette vor der Inkubation mit Bromcyan eine Reaktivierung evt. alkylierter Methionine durch Reduktion im alkalischen Medium versucht (Nieder und Bohak, 1972) (s. C.3.9.1.1.).

Tab. 8 Fragmentierungsversuche mit Bromcyan

V o r b e h a n d l u n g	BrCN:Protein/BrCN (w/w)	Inkubationszeit h	Gehalt an Homoserin %
a) NATIVES AKROSIN			
lösen in 70% HCOOH	1:5	12 - 48	20
lösen in 70% HCOOH, 30% Butanol, 0,1% Brij	1:10		25
lösen in 70% HCOOH, 0,1% SDS	1:100		25
lösen in 70% HCOOH, 2M Urea	1:10	12 - 24	20 - 25
lösen in 70% HCOOH, 8M Urea	1:10	12 - 24	20 - 25
lösen in 100% HCOOH	1:10	12 - 24	25
lösen in 70% TFA	1:10	12 - 24	25
reduzieren in einer Lösung aus 0,1M NH_4HCO_3 , 5% Mercaptoäthanol, pH 8, 24 h, anschl. lösen in 70% HCOOH	1:10	24	20
			20
			35
b) S-CARBOXYMETHYLIERTE SCHWERE KETTE			
lösen in 70% HCOOH	1:5	12 - 48	20
lösen in 100% HCOOH	1:10		25
lösen in 70% TFA	1:100		25
reduzieren in einer Lösung aus 0,1M NH_4HCO_3 , 5% Mercaptoäthanol, pH 8, 24 h, anschl. lösen in 70% HCOOH	1:10	12 - 24	20
	1:10	12 - 24	25
	1:10	24	40

Wie in Tabelle 8 ersichtlich, konnte in keinem der durchgeführten Versuche eine auch nur annähernd komplette Spaltung erzielt werden. Da das beste Spaltergebnis mit S-carboxymethylierter schwerer Kette nach vorausgegangener Reduktion der Methionine erhalten wurde (Ausbeute an Homoserin: 40%, s. Tab.8), wurde eine Spaltung unter diesen Bedingungen mit 75 nMol S-carboxymethylierter schwerer Kette durchgeführt (s. C.3.9.1.1.). Es war jedoch zu erwarten, daß die Isolierung der aus dieser incompletten Spaltung resultierenden Bruchstücke auf Grund der Heterogenität des Spaltgemisches Schwierigkeiten bereiten würde (s. D.3.5.3.).

D.3.5.1. Isolierung der Bromcyanfragmente

Bei der Isolierung der Bromcyanfragmente wählten wir als Elutionsmittel wässrige Trifluoressigsäurelösung, die die Extinktionsmessung im Eluat bei kürzeren Wellenlängen als eine Ameisensäure-Harnstofflösung erlaubt auf Grund geringer Eigenabsorption in diesen Wellenlängenbereichen und somit auch eine Detektion UV-negativer Peptide ermöglicht. Da, bedingt durch den hydrophoben Charakter des Proteins, bisher eine Eluierung unter Harnstoffzusatz ratsam schien, wurden die Elutionsbedingungen beim Arbeiten in harnstofffreier Trifluoressigsäurelösung dahingehend variiert, daß die Verweildauer des Proteingemisches auf hydrophoben Gelmatrizes verringert und somit durch hydrophobe Wechselwirkungen bedingte Proteinverluste reduziert wurden.

Aus diesen Überlegungen heraus wählten wir für die säulenchromatographische Trennung der Bromcyanfragmente zwei hintereinandergeschaltete Ultropac-TSK-Säulen von LKB (s. C.2.2.). Diese Säulen wurden im Zuge der fortschreitenden HPLC-Technologie speziell für die Trennung von Proteinen entwickelt. Eine inerte stabile mikroporöse stationäre Phase mit kleinem Skelettvolumen erlaubt

hoch auflösende Trennungen. Bedingt durch eine relativ geringe Säulengröße sind schnelle Trennungen möglich, wobei unspezifische adsorptive Wechselwirkungen und Proteinverluste durch kurze Kontaktzeit mit dem Säulenmaterial weitgehend ausgeschlossen werden. In Abbildung 28 ist das Elutionsprofil der auf diesen Säulen durchgeführten Trennung der Bromcyanfragmente wiedergegeben. Die Bezeichnung der Pools erfolgte auf Grund ihrer Elutionsreihenfolge mit CB_I - CB_{IV} . Der Gipfel beim Elutionsvolumen 50 ml zeigte neben Salzen und Reagentien keinen nennenswerten Gehalt an Aminosäuren.

D.3.5.2. Charakterisierung der Pools der TSK-Chromatographie

Die isolierten Komponenten wurden durch SDS-Gelelektrophorese, Aminosäureanalyse und N-terminale Sequenzanalyse charakterisiert.

Der Pool CB_I :

Die Aminosäureanalyse zeigte viel Methionin neben wenig Homoserin; in der SDS-Gelelektrophorese war hauptsächlich die bekannte Proteinbande der schweren Kette ersichtlich. Ein N-terminaler Abbau von 4 Schritten zeigte zu 90% die bekannten N-Termini der schweren Kette, daneben waren in geringerem Maße zwei weitere Sequenzen vorhanden, die offensichtlich durch inkomplette Spaltung an den bekannten Methioninen in Position 5 und 15 der schweren Kette entstanden sind.

1. Schritt: Val , (Ser , Val)
2. Schritt: Val , (Ala , Ser)
3. Schritt: Gly , (Glu , Leu)
4. Schritt: Gly , (Pro , Gln)

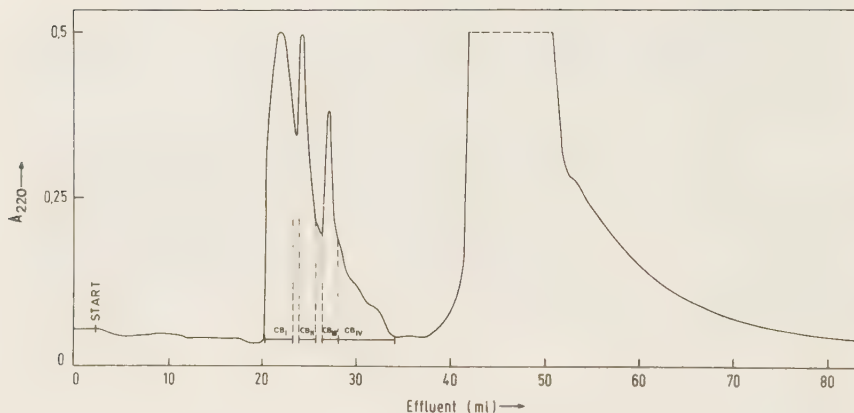


Abb. 28 Chromatographische Trennung der Bromcyanfragmente an zwei hintereinandergeschalteten Ultro-Pac-TSK-Säulen in 0,04% Trifluoressigsäure

Material: 3 mg (75 nMol) reine S-carboxymethylierte schwere Kette nach BrCN-Spaltung
 Säulen: Ultro-Pac-TSK-G 2000SW ($10 \pm 2 \mu$)
 Ultro-Pac-TSK-G 3000SW ($10 \pm 2 \mu$)
 Vorsäule: TSK-GSWP ($10 \pm 2 \mu$)
 Totalvolumen: 80 ml
 Durchflußgeschw.: 6 ml/h

Die Pools sind durch unterbrochene Linien gekennzeichnet und mit CB_I bis CB_{IV} bezeichnet.

Da durch die Bromcyanspaltung an diesen Amino-endständigen Methioninen die schwere Kette nur geringfügig verkürzt wurde, wurde auf eine weitere Auftrennung des in diesem Pool enthaltenen Gemisches verzichtet.

Der Pool CB_{II}:

Vier Schritte der N-terminalen Sequenzanalyse im Sequenator zeigten, daß in Pool CB_{II} ein Gemisch von folgenden zwei Sequenzen enthalten ist:

1.Schritt: Cys , Tyr
2.Schritt: Arg , His
3.Schritt: Asp , Asn
4.Schritt: Arg , Asn

Da die Sequenzfolge -Tyr-His-Asn-Asn- aus der N-terminalen Sequenz der schweren Kette bekannt ist (s. D.3.3.) und durch Spaltung am Methionin in Pos. 22 entstanden ist, wurde auf eine weitere Auftrennung dieses Gemisches verzichtet und die erste Sequenz im Subtraktionsverfahren bestimmt. Sie lautet:

1	10	14
Cys-Arg-Asp-Arg-Ala-Glu-Asn-Thr-Phe-Val-Gly-Ile-Gly-Ser-		

Abb.29 N-terminale Sequenz von Pool CB_{II}

Mit diesem 14-Reste Fragment wurde ein Überlappungspeptid für die Position 26 der in Abbildung 23 angegebenen Sequenz eines autoproteolytischen Bruchstückes erhalten.

Schwierigkeiten verbunden ist.

Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 31 die theoretische Ausbeute an Fragmenten dargestellt, die bei einer 60%igen Spaltung an drei Spaltstellen zu erwarten ist. Während man durch eine unvollständige Spaltung an zwei Spaltstellen bereits sechs Fragmente an Stelle von drei erwarteten erhält, liefert eine Spaltung an drei Spaltstellen bereits zehn Fragmente und eine Spaltung an vier Spaltstellen sogar fünfzehn, etc. Folglich war abschätzbar, daß die bei Akrosin nur mit 40%iger Effektivität durchführbare BrCN-Spaltung in sehr begrenztem Maße Aussagen zuließ.

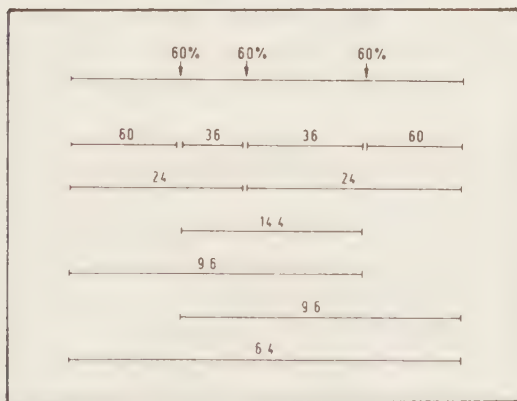


Abb.31 Theoretische Ausbeute der Fragmente in Mol% bei einer 60%igen Spaltung an drei Spaltstellen

D.3.6. Tryptische Spaltung

Mit 27 Argininen und 16 Lysinen enthält Akrosin 43 potentielle Spaltstellen für Trypsin, so daß bei vollständiger tryptischer Verdauung viele kleine Peptide mit einer durchschnittlichen Größe von 10 Resten mit den daraus resultierenden Schwierigkeiten bei der Peptidisolierung- und -zuordnung zu erwarten waren. Auch die nach Arginin- oder Lysin-spezifischer Spaltung durch vorherige Modifikation der jeweiligen Aminosäure erhältlichen Bruchstücke genügen in ihrer Zahl und Größe nicht der erwünschten Produktion möglichst langer, sequenatorgerechter Fragmente. Außerdem wird durch jede zusätzliche Manipulation die Ausbeute vermindert und die Gefahr der Nebenreaktionen erhöht. Insofern erschien uns eine tryptische Spaltung am nativen Molekül am sinnvollsten, wobei versucht wurde, durch variierende Inkubationsbedingungen den tryptischen Angriff auf exponierte Peptidbindungen zu limitieren und somit die Zahl der Fragmente zu beschränken.

D.3.6.1. Vorversuche im analytischen Maßstab

Getestet wurde das Spaltergebnis in Abhängigkeit der Faktoren Trypsinkonzentration, pH, Inkubationszeit, Denaturierung (s. C.3.9.2.2.). Die entstandenen Produkte wurden jeweils durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

In Abbildung 32 ist das Ergebnis einer Digestion bei pH 8, 37°C, unter Zusatz von 2 M Harnstoff nach verschiedenen Reaktionszeiten wiedergegeben. Das Verhältnis von Trypsin zu Akrosin war 1: 100 (w/w).

Da die bei einer Inkubationszeit von 1 Stunde bis 8 Stunden auftretenden Bruchstücke in ihrem Molekulargewicht den bei der limitierten Autoproteolyse erhaltenen entsprechen (s. Abb.24), wurde für einen Ansatz im präparativen Maßstab eine Inkubations-

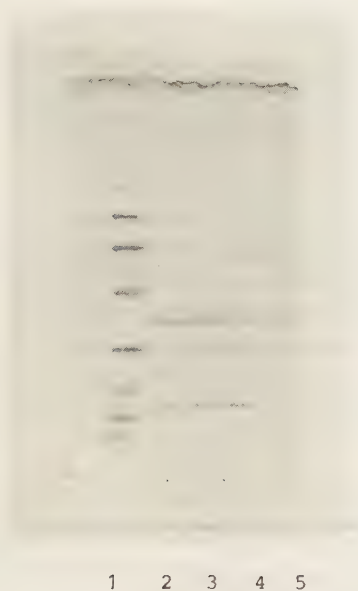


Abb.32 SDS-Gelelektrophorese (s.
 C.3.4.2.)
Vorversuche zur tryptischen
Spaltung

- | | | |
|---|---------------------------|------|
| 1 | Referenzproteine I | |
| 2 | Tryptische Hydrolyse nach | 1 h |
| 3 | Tryptische Hydrolyse nach | 4 h |
| 4 | Tryptische Hydrolyse nach | 8 h |
| 5 | Tryptische Hydrolyse nach | 24 h |

dauer zwischen 8 und 24 Stunden gewählt, um eine zur Autoproteolyse variierende Fragmentierung zu erzielen.

D.3.6.2. Präparative Durchführung der tryptischen Spaltung

Nach 12-stündiger tryptischer Digestion (s. C.3.9.2.2.) wurde der Inkubationsansatz entsprechend dem Trennschema in Abbildung 33 auf einer Sephadex G50 sf-Säule aufgetrennt.

Die Bezeichnung der Peaks erfolgte auf Grund ihrer Elutionsreihenfolge mit T_I - T_V . Der Pool T_V enthielt neben Salzen und Reagentien keinen nennenswerten Gehalt an Aminosäuren.

D.3.6.3. Charakterisierung der Pools der Gelchromatographie auf Sephadex G50 sf

Die separierten Komponenten wurden an Hand der SDS-Gelelektrophorese, Aminosäureanalyse und N-terminalen Sequenzanalyse untersucht.

Der Pool T_I :

Alle Daten für die in diesem Pool enthaltene Komponente stimmen mit denen von ungespaltener schwerer Kette überein.

Die N-terminale Sequenzanalyse ergab Val-Val-Gly-Gly-.

Der Pool T_{II} :

Das Material dieses Pools zeigte in der SDS-Gelelektrophorese eine Proteinbande bei $M_{\text{r}} \sim 10\,000$ und war N-terminal rein.

In Abbildung 34 ist die Sequenz dieser Komponente angegeben, soweit sie bestimmt werden konnte.

Die Aminosäuresequenz nach dem Methionin in Position 8 ist mit der des Bromcyanfragmentes CB_{III} (s. Abb.30) identisch.

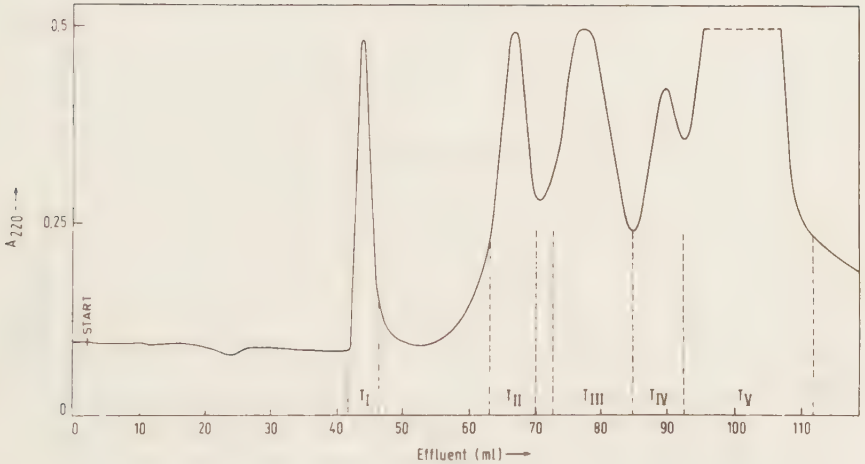


Abb.33 Gelchromatographie an Sephadex G50 in 0,04% Trifluor-essigsäure

Material: 3 mg (75 nMol) Akrosin nach tryptischer Spaltung, reduziert, S-carboxymethyliert

Säulendimensionen: 1 x 150 cm

Totalvolumen: 115 ml

Durchflußgeschw.: 5 ml/h

Die Pools sind durch unterbrochene Linien gekennzeichnet und mit T_I bis T_V bezeichnet.

1	10	14
Ile-Gly-Ser-Asn-Ala-Leu-Gln-Met-Val-Gln-Leu-Gly-Thr-Pro-		
16		
-Ser-Arg-Pro-		

Abb.34 N-terminale Sequenz von Pool T_{II}

Der Pool T_{III}:

In diesem Pool war ein Peptidgemisch enthalten, das durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie weiter aufgetrennt wurde (s. C.3.3.2. und Abb.35). Die erhaltenen Peaks wurden durch Aminosäureanalyse untersucht; geeignete Peaks wurden anschließend N-terminal sequenziert.

Die bei den Retentionszeiten 17,27 und 38,61 eluierten Peptide waren identisch mit den in D.3.4.3.5. identifizierten autoproteolytischen Peptiden, die bei den Retentionszeiten 17,67 und 38,60 eluiert wurden.

In Tabelle 9 sind die Sequenzen der untersuchten Peptide angegeben.

Der Pool T_{IV}:

Die Aminosäureanalyse zeigte neben einzelnen Aminosäuren sehr viel Salz und Harnstoff.

Nach einer weiteren Auftrennung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie enthielten die einzelnen Peaks nicht mehr genügend Material, um eine N-terminale Sequenzanalyse durchzuführen.

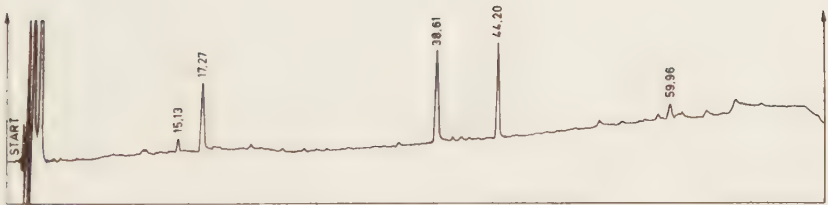


Abb.35 Hochdruckflüssigkeitschromatographie von Pool T_{III}
an einer reversed-phase RP-18-Säule

Probe:	ein Drittel von Pool T _{III}
Auftragsvolumen:	200 µl
Durchflußgeschw.:	1,5 ml/min
Detektion:	210 nm (0,025 AUFS)
Gradient:	2,5 bis 40% Acetonitril (s. C.3.3.2.)

Tab.9 Peptide, die durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie aus Pool T_{III} separiert wurden

Retentionszeit	S e q u e n z
17,27	¹ Thr-Ser-Pro-Thr-Leu-Gln-Glu-Ala-Arg ⁹
38,61	¹ Phe-Val-Glu-Glu-Ile-Ile-Ile-His-Glu ¹⁰ Gly-Lys
44,20	¹ Tyr-Val-Ser-Gly-Leu-Glu-Ile-Asn-Asp- ¹⁰ Ile-Ala-Leu-Ile-Lys ¹⁴

D.3.7. Chymotryptische Spaltung

Beim pH-Optimum von Chymotrypsin (pH 8,5) zeigt natives Akrosin ebenfalls autoproteolytische Spaltaktivität. Um eine zusätzliche Autoproteolyse zu vermeiden, wurde zur chymotryptischen Spaltung S-carboxymethylierte schwere Kette eingesetzt. Nach 3-stündiger chymotryptischer Digestion (s. C.3.9.2.6.) wurde der Inkubationsansatz entsprechend dem Elutionsprofil in Abbildung 36 auf einer "reversed-phase" Vydac TPRP 10-Säule aufgetrennt.



Abb.36 Hochdruckflüssigkeitschromatographie des chymotryptischen Spaltgemisches an einer reversed-phase Vydac TPRP 10-Säule (s. C.3.3.1.)

Probe:	ein Fünftel eines Ansatzes von 2 mg (50 nMol) S-carboxymethy- lierter schwerer Kette nach chy- motryptischer Spaltung
Auftragsvolumen:	200 µl
Durchflußgeschw.:	1,5 ml/min
Detektion:	210 nm (0,025 AUFS)
Gradient:	5 bis 70% Acetonitril

Das zu den Retentionszeiten 45,67 bis 50,79 eluierte Material enthielt durch Chymotrypsin nicht angegriffene schwere Kette, was durch Aminosäureanalyse und SDS-Elektrophorese belegt wurde. Der größte Teil des zur Spaltung eingesetzten Materials wurde also ungespalten eluiert. Auch eine längere Spaltzeit bis zu 20 Stunden zeigte keine wesentliche Verbesserung der Spaltrate.

In Tabelle 10 sind die Sequenzen der Peptide angegeben, die nach vorheriger Aminosäureanalyse für eine N-terminale Sequenzanalyse geeignet erschienen. Da die Aminosäureanalyse außerdem erkennen ließ, daß es sich ausschließlich um kurze Peptide handelt, wurde die Sequenz im manuellen Edman-Abbau bestimmt (s. C.3.5.2.). Die Zuordnung der erhaltenen Peptidsequenzen in bekannte Sequenzabschnitte war in keinem Fall möglich.

Tab.10 Peptide, die durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach chymotryptischer Spaltung isoliert wurden

Retentionszeit	S e q u e n z
11,65	1 5 Ala-Gly-Pro-Pro-Arg
17,11	1 4 Val-Thr-Gly-Trp
19,16	1 6 Leu-Asn-Thr-Trp-Pro-Tyr
33,56	1 5 Ala-Pro-Gly-Val-Arg
40,30	1 Gln-Arg-Pro-Pro-Gly-Pro-Ser-Gln-His- 10 Pro-Gly-

Die enzymatische Hydrolyse durch Chymotrypsin an den Carboxylenden hydrophober Aminosäuren ist relativ unspezifisch und schwer vorauskalkulierbar, wobei Prolin als unmittelbar benachbarte Aminosäure keine Spaltung erlaubt (Kaspar 1970). Da Akrosin außergewöhnlich viele Proline besitzt, ist der geringe Spalterfolg mit dieser Protease nicht erstaunlich.

D.3.8. Spaltung mit Staphylococcus aureus V8 Protease

Es wurde der Versuch unternommen, durch spezifische Spaltung am C-Terminus von Glutamin- und Asparaginsäure mit der Protease aus Staphylococcus aureus definierte Fragmente zu erhalten. Durch gezielte Pufferwahl (0,05 M Ammoniumacetat, pH 4,0) kann die Hydrolyse auf Glutaminsäurebindungen schränkt werden (s. C.3.9.2.3.).

Es wurden mehrere Ansätze unter variierenden Bedingungen ausgeführt, z.B. Inkubationszeiten von 2 bis 24 Stunden oder Zusatz von Enzym von 2% bis 10%. Die Überprüfung der Spaltrate durch eine N-terminale Poolsequenzanalyse des jeweiligen Spaltansatzes zeigte nur unter den Bedingungen pH 4,0, 24-stündige Inkubationsdauer, 5% Enzym eine zweite Sequenz und damit das Auftreten einer Spaltstelle.

Ein unter diesen Bedingungen durchgeführter Inkubationsansatz im präparativen Maßstab (s. C.3.9.2.3.) wurde auf einer "reversed-phase" Vydac TPRP 10-Säule aufgetrennt. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 37 dargestellt.

Der Hauptanteil des zur Spaltung eingesetzten Materials wurde zu den Retentionszeiten 41,76 bis 42,43 ungespalten eluiert. Von allen weiteren eluierten Peaks zeigte nur das zur Retentionszeit 35,86 eluierte Material in einer Aminosäureanalyse genügend Pro-

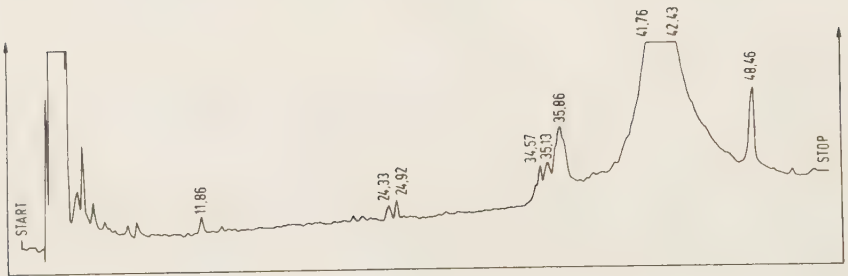


Abb.3/ Hochdruckflüssigkeitschromatographie des Spaltgemisches mit *Staphylococcus aureus* V8 Protease an einer reversed-phase Vydac TPRP 10-Säule (s. C.3.3.1.)

Probe:	ein Fünftel eines Spaltansatzes von 2 mg S-carboxymethylierter schwerer Kette nach Inkubation mit <i>Staphylococcus aureus</i> V8 Protease
Auftragsvolumen:	200 μ l
Durchflußgeschw.:	1,5 ml/min
Detektion:	210 nm (0,025 AUFS)
Gradient:	5 bis 70% Acetonitril

tein für eine N-terminale Sequenzanalyse an.

Es konnte eine Sequenz von 12 Schritten bestimmt werden, die in Abbildung 38 angegeben ist.

Die Ergebnisse der unter variierenden Bedingungen durchgeführten Spaltung mit *Staphylococcus aureus* V8 Protease zeigten, daß die Glutamyl- bzw. Aspartylbindungen in der schweren Kette des Akrosins einem Angriff dieser Protease nicht sehr zugänglich sind. Verschiedene Autoren berichten, daß der Natur der umgebenden Aminosäuren eine große Bedeutung zukommt, wobei Glu-Pro-Bindungen im allgemeinen nicht hydrolysiert werden (Sutton et al., 1977). Vandekerckhove und van Montagu (1977) fanden, daß Proteine mit hydrophobem Charakter besonders resistent sind gegen einen Angriff dieser Protease. Da Akrosin sowohl außergewöhnlich viele Proline besitzt, als auch sehr hydrophob ist, ist das Nichtfunktionieren dieser enzymatischen Spaltung nicht verwunderlich.

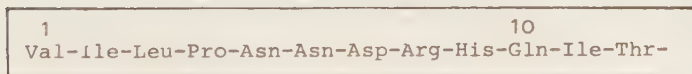


Abb.38 N-terminale Sequenz des zur Retentionszeit 35,86 eluierten Materials aus Abb.37

D.3.9. Digestion mit Thrombin, Kallikrein, Agkistrodon
 contortrix, Collagenase

Auf der Suche nach weiteren spezifischen Spaltungen wurden verschiedene Proteasen in analytischen Vorversuchen eingesetzt (s. C.3.9.2.4.). Verwendet wurden Thrombin, Kallikrein, eine Schlangengift-Protease mit Thrombin-ähnlicher Spezifität und Collagenase, eine bakterielle Proteinase; Collagenase besitzt eine enge Spezifität und spaltet zu 60% die Peptidbindungen von Gly-Pro-Sequenzen im Collagen (Michaels et al., 1958). Die entstandenen Produkte wurden jeweils durch SDS-Gelelektrophorese überprüft. In Abbildung 39 und 40 sind die Digestionen mit nativem Akrosin und mit S-carboxymethylierter schwerer Kette dargestellt, wobei jeweils nach 2 und 24 Stunden Proben entnommen wurden. Während das native Akrosinmolekül auch nach 24 Stunden kaum proteolytisch abgebaut wurde (Vergleich mit Blindwert 1 und 2), erfolgte bei der S-carboxymethylierten reinen schweren Kette bereits nach 2 Stunden ein deutlicher Abbau durch Kallikrein und Collagenase. Die Digestionen mit Thrombin und der Schlangengift-Protease waren weniger erfolgreich. Enzymatische Hydrolysen mit Kallikrein und Collagenase sind geplant.

D.3.10. Weitere chemische Spaltungen

Eine Spaltung an den Tryptophanen mit BNPS-Skatol und die oxidative Spaltung mit N-Bromsuccinimid an den Carboxylgruppen von Tyrosin und Tryptophan ergab sowohl beim Einsatz des nativen Akrosins, als auch der S-carboxymethylierten schweren Kette keine definierten Bruchstücke.

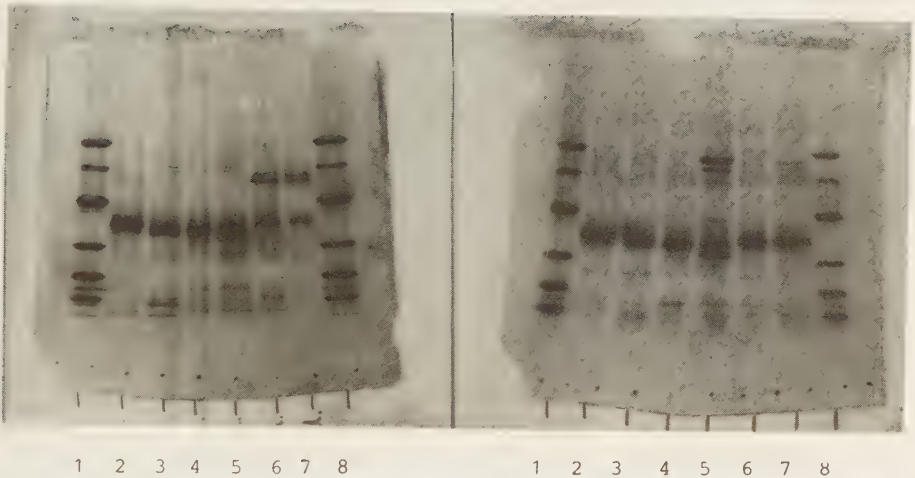


Abb.39 SDS-Gelelektrophorese (s. C.3.4.2.)
Enzymatische Digestion von nativem Akrosin
nach 2 h (links) und 24 h (rechts)

- 1 und 8 Referenzproteine I
- 2 Akrosin + Thrombin
- 3 Akrosin + Kallikrein
- 4 Akrosin + Agkistrodon contortrix
- 5 Akrosin + Collagenase
- 6 Blindwert 1
- 7 Blindwert 2

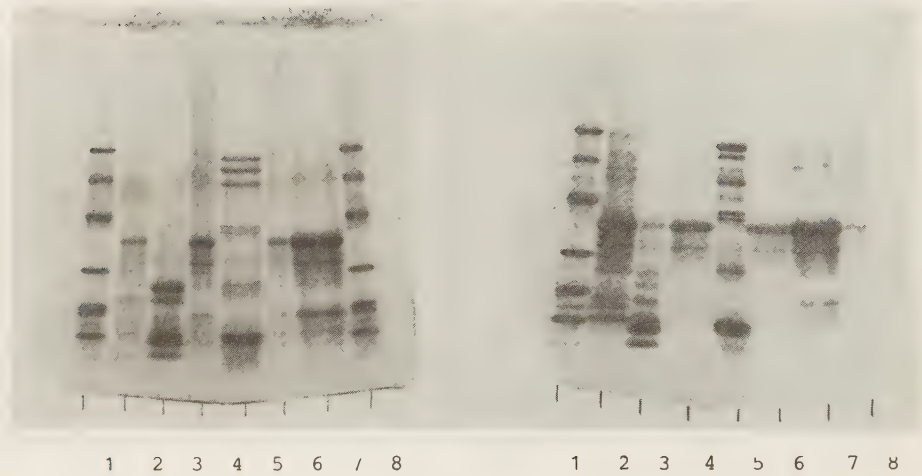


Abb.40 SDS-Gelelektrophorese (s. C.3.4.2.)
Enzymatische Digestion von S-carboxymethylierter
reiner schwerer Kette nach 2 h (links) und 24 h
(rechts)

- | | |
|---------|--------------------------------------|
| 1 und 8 | Referenzproteine I |
| 2 | SCM-Akrosin + Thrombin |
| 3 | SCM-Akrosin + Kallikrein |
| 4 | SCM-Akrosin + Agkistrodon contortrix |
| 5 | SCM-Akrosin + Collagenase |
| 6 | Blindwert 1 |
| 7 | Blindwert 2 |

D.3.11. Bisher ermittelte Sequenz der schweren Kette

Die bisher aufgeklärten Sequenzabschnitte der schweren Kette des Eberakrosins sind in Abbildung 41 dargestellt.

In einem automatisierten Sequenatorlauf konnte die Sequenz von 52 N-terminalen Aminosäuren an der S-carboxymethylierten schweren Kette bestimmt werden. Dieser Sequenzabschnitt zeigt ausgeprägte Ähnlichkeit mit den N-terminalen Sequenzen der zum Vergleich herangezogenen anderen Serinproteinasen (s. E.2.2.). Eine hierauf gegründete Zuordnung der schweren Kette des Akrosins zu den bekannten Vergleichssequenzen wird durch zwei weitere autoproteolytische Bruchstücke von 39 (s. Abb.23) und 21 (s. Abb. 26) Aminosäuren bestätigt, die sich dem C-terminalen Bereich der Vergleichssequenzen zuordnen lassen.

Die autoproteolytische Hydrolyse erbrachte 8 weitere Peptide, die durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie rein isoliert werden konnten und sequenziert wurden. Ihre Einordnung in die Sequenz ist nicht in jedem Fall möglich.

Der tryptische Abbau von nativem Akrosin lieferte 4 Fragmente, die zum Teil identisch waren mit denen durch Autoproteolyse erhaltenen. Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, da beide Proteasen gleiche Spaltspezifität besitzen (s. B.5.4.).

Die Zuordnung des aus der Bromcyanspaltung resultierenden Bruchstückes CB_{III} war möglich, da ein Überlappungspeptid mit dieser Sequenzfolge aus der tryptischen Spaltung resultierte (T_{II}).

Ein zweites Bruchstück aus der Bromcyanspaltung, das in Pool CB_{II} enthalten war, konnte einem autoproteolytischen Bruchstück zugeordnet werden (s. Abb. 23).

Die Einordnung von 5 chymotryptischen Peptiden (s. Tab.10) und einem aus der Spaltung mit *Staphylococcus aureus* V8 Protease resultierenden Bruchstück (s. Abb.38) in die Sequenz war nicht möglich.

Die bisher bestimmten Sequenzpositionen erfassen 83% der schweren Kette.

D.4. Die leichte Kette

D.4.1. Reindarstellung der leichten Kette

Wie in D.2.2. beschrieben, ließen sich die schwere und die leichte Kette nach reduktiver Spaltung der Disulfidbrücken sowohl auf Grund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße durch Gelfiltration, als auch auf Grund unterschiedlicher Hydrophobizität durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer "reversed-phase"-Säule voneinander trennen.

Während durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie die beiden Komponenten unmittelbar in reiner Form isoliert werden konnten (s. D.2.2.3.), wurde bei der Trennung mittels Gelfiltration die leichte Kette im Gemisch mit anderen Peptiden isoliert (s. D.2.2.2.), was eine Nachreinigung notwendig machte.

Somit wurde die im Peptidgemisch von Pool F aus Abbildung 12 enthaltene leichte Kette durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer "reversed-phase" RP 18-Säule nachgereinigt (s. C.3.3.2.) und in reiner Form eluiert.

Wie aus Abbildung 42 hervorgeht, fand eine Auftrennung in mehrere Komponenten statt. Nach der Aminosäureanalyse wurden die zur Sequenzierung geeigneten Peaks N-terminal untersucht. Der bei der Retentionszeit 12,0 eluierte Peak enthielt die gesuchte leichte Kette in reiner Form. Aus der relativ kurzen Retentionszeit konnte auf einen geringen Gehalt an hydrophoben Aminosäuren der leichten Kette geschlossen werden.

D.4.1.1. N-terminale Charakterisierung der durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie neben der leichten Kette separierten Komponenten aus Abbildung 42

Während die N-terminale Sequenz für die leichte Kette in Kapitel D.4.3. ausführlicher behandelt wird, werden in Tabelle 11 die Se-

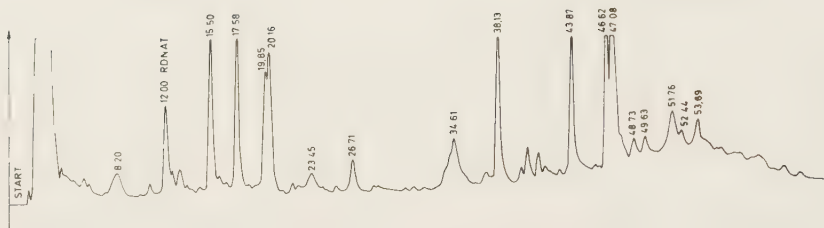


Abb.42 Hochdruckflüssigkeitschromatographie von Pool F aus Abb.12 an einer reversed-phase RP 18-Säule

Probe:	die Hälfte von Pool F
Auftragsvolumen:	200 μ l
Durchflußgeschw.:	1,5 ml/min
Detektion:	210 nm (0,025 AUFS)
Gradient:	2,5 bis 40% Acetonitril (s. C.3.3.2.)

quenzen der zusätzlich aufgetrennten Peptide angegeben. Die bei den Retentionszeiten 15,50, 17,58, 38,13, 43,87, 46,62 und 47,08 eluierten Peptide sind identisch mit den in D.3.4.3.5. und D.3.6.3. bei entsprechenden Retentionszeiten erhaltenen autoproteolytischen und tryptischen Peptiden.

Tab.11 Peptide, die neben der leichten Kette durch Hochdruck-flüssigkeitschromatographie aus Pool F separiert wurden

Retentions-zeit	S e q u e n z
15,50	110 Ile-Asp-Thr-Cys-Gln-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu- 15 Met-Cys-Arg
17,58	19 Thr-Ser-Pro-Thr-Leu-Gln-Glu-Ala-Arg
26,71	19 Pro-Pro-Gly-Pro-Ser-Gln-His-Pro-Gly-
38,13	110 Phe-Val-Glu-Glu-Ile-Ile-Ile-His-Glu-Gly-Lys
43,87	110 Tyr-Val-Ser-Gly-Leu-Glu-Ile-Asn-Asp-Ile-Ala-
46,62	110 Ala-Pro-Gln-Thr-Asp- X -Ile- X -Gly-Thr-
47,08	110 Ile-Thr-Pro-Pro-Val-Pro-Pro-Gly-Pro-Phe-Ile-

D.4.2. Aminosäurezusammensetzung

Von der reinen leichten Kette wurde eine Aminosäureanalyse durchgeführt (s. Tabelle 12).

Diese zeigt 23 Aminosäuren. Es errechnet sich daraus ein MG von 2 743 für den Proteinanteil.

Aus der Aminosäurezusammensetzung erklärt sich die relativ kurze Retentionszeit, bei der die leichte Kette durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie von der "reversed-phase" Säule eluiert wurde. Nach Meek (1980) kann man die Retentionszeit eines Peptides aus der Aminosäurezusammensetzung vorausberechnen, wobei man die Retentionskoeffizienten der einzelnen Aminosäuren addiert.

Aminosäuren mit aromatischen oder langen aliphatischen Seitenketten liefern stark positive Beiträge zur Retention, diejenigen mit sauren Seitenketten stark negative, und die mit basischen oder mit kleinen neutralen Seitenketten nur geringfügige Beiträge zur Retention.

D.4.3. Zuckeranalyse

Die Kohlenhydratanalyse ergab nur einen Glukosamingehalt von 1,65 Mol. Neutralzucker konnten nicht festgestellt werden.

Da in der schweren Kette kein Kohlehydrat enthalten ist (s. D. 3.2.) wurde angenommen, daß die leichte Kette den Gesamtkohlehydratgehalt des Moleküls trägt. Es errechnet sich dann ein MG von $\sim 4\ 200$ für die leichte Kette. Nachdem in der Zuckeranalyse der leichten Kette nur 1,65 Mol Glukosamin gefunden wurden, liegt die Vermutung nahe, daß durch vorausgegangene Manipulationen im Verlauf der Isolierung der leichten Kette der Hauptteil der Polysaccharidkette hydrolytisch abgespalten wurde.

Tab.12 Aminosäureanalyse der leichten Kette

Amino- säure	R e s t e	
	leichte (a)	Kette (b)
Asp	2,76	3
Thr	1,07	1
Ser	1,18	1
Glu	2,15	2
Pro	1,17	1
Gly	3,19	3
Ala	1,0	1
Cys	1,66	2
Val	-	- ⁺
Met	0,74	1
Ile	-	-
Leu	2,11	2
Tyr	-	-
Phe	0,85	1
Lys	0,99	1
His	-	-
Arg	3,67	4
Tryp	n.b.	- ⁺⁺
GlcNac	1,65	2
Total		23

⁺ Wert nach 72h Hydrolyse

⁺⁺ aus der Sequenzanalyse

(a) berechnete Aminosäurereste/Mol Protein

(b) ganzzahlige Werte

n.b. nicht bestimmt

D.4.4. N-terminale Aminosäuresequenz

Die reine leichte Kette wurde einem automatisierten Sequenzabbau unterzogen und "durchsequenziert".

Die Sequenz ist in Abbildung 43 angegeben. In der Position 3 vom N-Terminus aus gerechnet konnte keine PTH-Aminosäure bestimmt werden. Die Aufklärung dieser Sequenzposition erfolgt in Kapitel D.4.6.

1										10
Arg-Asp-	X	-Ala-Thr-Cys-Asp-Gly-Pro-Cys-Gly-Leu-Arg-Phe-Arg-								
			20			23				
-Gln-Lys-Leu-Glu-Ser-Gly-Met-Arg										

Abb.43 N-terminale Aminosäuresequenz der leichten Kette

D.4.5. Bestimmung des C-Terminus

Zum Beweis, daß mit dem Arginin in Pos.23 wirklich die C-terminale Aminosäure sequenziert worden war, wurde der in Abbildung 44 schematisierte Versuch durchgeführt:

Die Sequenzbestimmung der leichten Kette hatte für die vorletzte Position vor dem C-Terminus einen Methioninrest gezeigt. Folglich mußte durch eine Bromcyanspaltung an diesem Methionin die C-termi-

Aus S-carboxymethyliertem Ausgangsmaterial isolierte reine
leichte Kette

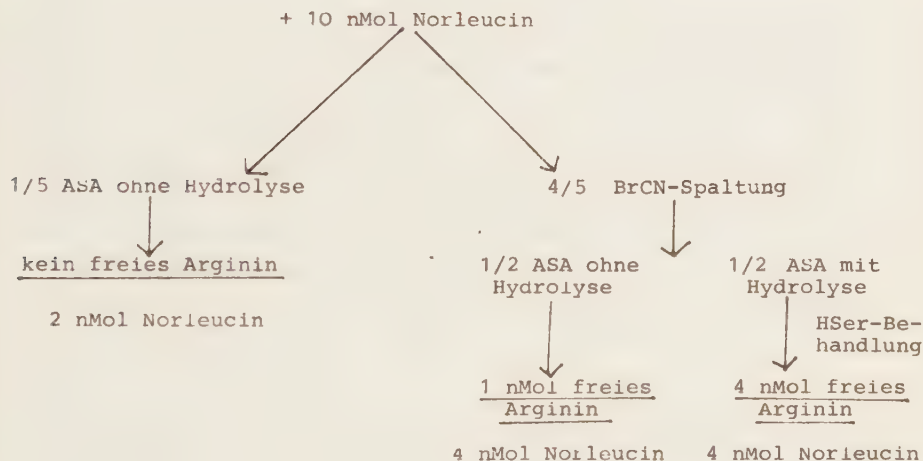


Abb.44 Schema der Versuchsdurchführung zur Bestimmung des C-Terminus

nale Aminosäure freigesetzt werden und als freies Arginin in der Aminosäureanalyse des unhydrolysierten Spaltgemisches erscheinen. Die Analyse nach vorheriger Totalhydrolyse sollte dann den vierfachen Gehalt an Arginin zeigen, entsprechend einem Gehalt von 4 Argininen in der Sequenz der leichten Kette (s. Abb.43).

Durch eine Kontrollanalyse mit ungespaltener, unhydrolysierter leichter Kette konnte ausgeschlossen werden, daß bereits vor der Bromcyanbehandlung freies Arginin im Ausgangsmaterial vorhanden

war. Bei allen Analysen wurde Norleucin als innerer Standard zugesetzt. In den Versuch wurde S-carboxymethylierte reine leichte Kette eingesetzt, die durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie aus 25 nMol Ausgangsmaterial isoliert wurde (s. D.2.2.3.). Die Bromcyanspaltung erfolgte nach vorheriger Reduktion der Methionine wie in C.3.9.1.1. beschrieben.

Nach der Bromcyanspaltung konnte ohne vorherige Hydrolyse freies Arginin in der Aminosäureanalyse nachgewiesen werden.

Nach der Totalhydrolyse zeigte die Aminosäureanalyse neben Homoserin kein Methionin im Spaltgemisch, was eine 100%ige Spaltung anzeigte. Der Gehalt an freiem Arginin war jetzt viermal so hoch wie ohne Hydrolyse. Die Sequenz endet somit mit dem Arginin in Position 23.

D.4.6. Bestimmung des Kohlehydrat-tragenden Asparaginrestes

In der Sequenzanalyse (s.D.4.4.) konnte in der Position 3 vom N-Terminus aus gerechnet keine PTH-Aminosäure bestimmt werden. Jedoch wurde aus folgenden Überlegungen heraus angenommen, daß die Leerstelle durch die Kohlehydrat-tragende Aminosäure Asparagin ersetzt ist:

- a) Die Sequenz und die Aminosäureanalyse differieren um einen Asparaginrest
- b) Die durchgeführten Kohlehydratanalysen ließen vermuten, daß der gesamte Zucker in der leichten Kette enthalten ist. Die beiden in Proteinen bisher aufgefundenen Typen von Kohlehydrat-Peptid-Verknüpfungen bestehen aus der Bindung von N-Acetylglukosamin an die Amidgruppe eines Asparaginrestes und der O-glykosidischen Bindung von N-Acetylgalaktosamin an Threonin oder Serin (Marshall und Neuberger, 1964). Die Bestimmung der Kohlehydratbestandteile von Akrosin hatte nur das Vorhandensein von Glukosamin, nicht je-

doch von Galaktosamin ergeben. Somit kann angenommen werden, daß die Polysaccharidkette im Akrosin an Asparagingebunden vorliegt.

Wie durch viele Beispiele belegt ist (Neuberger et al., 1972), folgt in Glykoproteinen auf den Kohlehydrat-tragenden Asparaginrest in der übernächsten Position in Richtung auf den C-Terminus eine 3-Hydroxy-Aminosäure, d.h. Threonin oder Serin.

Diese Voraussetzung ist in der leichten Kette erfüllt durch die Sequenz - $\overset{3}{X}$ -Ala-Thr-, wenn man annimmt, daß in Position 3 ein Asparaginrest vorhanden ist. Es ist bekannt, daß N-glykosilierte Asparaginreste zwar während der Sequenzbestimmung normal abgebaut werden; jedoch sind glykosilierte Anilinothiazolinone nicht in organischen Lösungsmitteln extrahierbar und somit kann keine PTH-Aminosäure in dieser Position identifiziert werden. Das Auftreten einer Leerstelle in Position 3 bei der Sequenzermittlung der leichten Kette spricht dafür, daß ein Polysaccharid-tragender Asparaginrest an dieser Stelle vorhanden ist.

Der Beweis wurde in folgendem Versuch erbracht, der in Abb.45 schematisch dargestellt ist:

40 nMol reine S-carboxymethylierte leichte Kette wurden durch manuellen Edman-Abbau zwei Schritte N-terminal abgebaut (s. C.3.5.2.) und durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie in einem isokratischen System als PTH-Arginin und PTH-Asparaginsäure identifiziert (s. C.3.3.3.).

In der dritten Position wurde eine normale Kupplung und Spaltung durchgeführt, jedoch keine Konvertierung der PTC-Aminosäure zur PTH-Aminosäure. Das Gemisch aus abgespaltener PTC-Aminosäure und Restpeptid wurde durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer "reversed-phase" Vydac TPRP 10-Säule aufgetrennt (s. Abb.46). Die erhaltenen Peaks wurden durch Aminosäureanalyse untersucht.

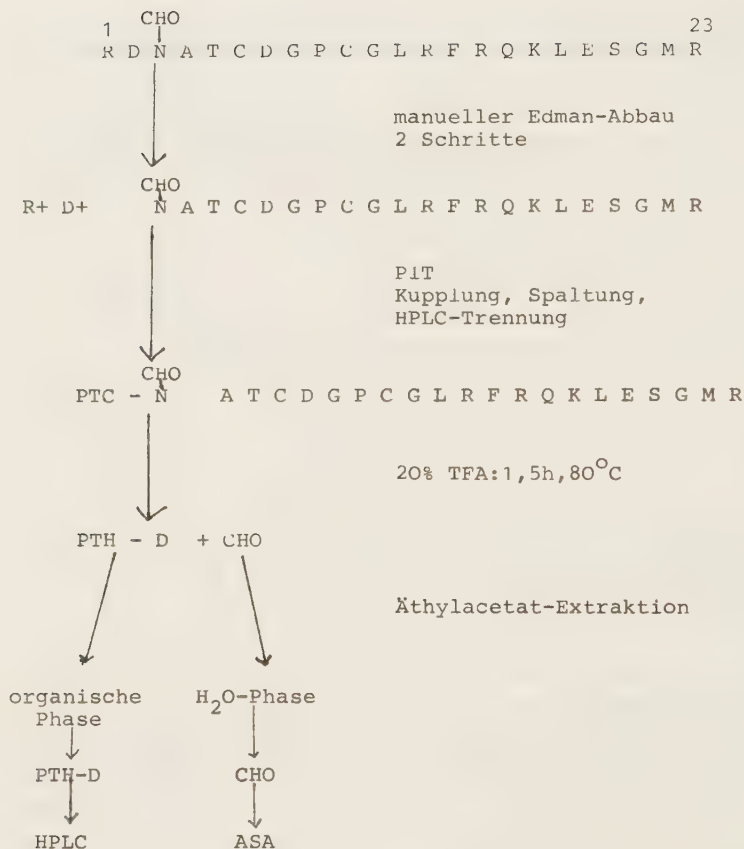


Abb.45 Versuchsdurchführung zum Nachweis des Kohlehydrat-tragenden Asparaginrestes

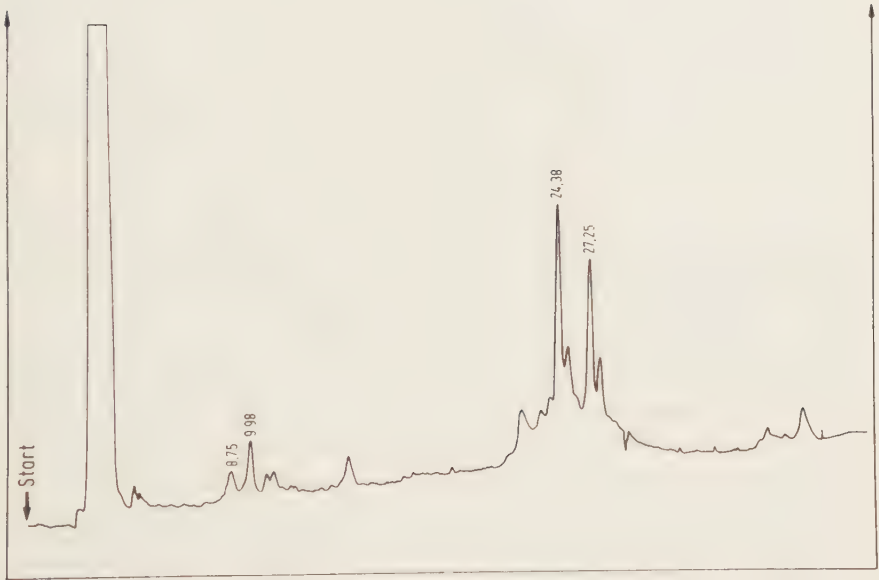


Abb.46 Hochdruckflüssigkeitschromatographie des Gemisches aus PTC-Aminosäure und Restpeptid an einer reversed-phase Vydac TPRP 10-Säule (s. C.3.3.1.)

Probe:	Gemisch aus PTC-Aminosäure und Restpeptid in 200 μ l 0,1% TFA
Durchflußgeschw.:	1,5 ml/min
Detektion:	210 nm (0,025 AUFS)
Gradient:	5 bis 40% Acetonitril in 40 min

Die zu den Retentionszeiten 8,75 und 9,98 eluierten Peaks zeigten in der Aminosäureanalyse nur Glukosamin und schienen daher die Kohlehydrat-tragende PTC-Aminosäure aus der Sequenzposition 3 zu enthalten (die zugehörige PTC-Aminosäure wird unter den angewandten Hydrolysebedingungen nur sehr schwach zur korrespondierenden Aminosäure hydrolysiert).

Die zu den Retentionszeiten 24,38 und 27,25 eluierten Peaks waren in der Aminosäureanalyse identisch und zeigten kein Kohlehydrat. Zur Identifizierung des in diesen Peaks enthaltenen Materials wurde eine N-terminale Sequenzanalyse von 4 Schritten durchgeführt (s. Abb.47).

In Übereinstimmung mit der Aminosäureanalyse waren beide Peaks N-terminal identisch und zeigten die in Abbildung 4/ angegebene Sequenz. Somit war in diesen Peaks das um drei Aminosäuren verkürzte Restpeptid der leichten Kette enthalten.

Dieses Restpeptid wurde analog der gesamten leichten Kette in 2 Peaks von der "reversed-phase"-Säule eluiert (s. Abb.17), jedoch bei einer höheren Acetonitrilkonzentration. Dies ist nicht verwunderlich, da durch das Abspalten der hydrophilen Kohlehydrat-bindungsstelle die Hydrophobizität des Restpeptids erhöht wurde.

Die restlichen Peaks aus Abbildung 46 zeigten keinen nennenswerten Anteil an Aminosäuren und stammen von Reagentien und Salzen.

1	4
Ala-Thr-Cys-Asp-	

Abb.47 Sequenz des zur Retentionszeit 24,38 und 27,25 eluierten Peptidmaterials

Die Kohlehydrat-tragende PTC-Aminosäure, die zu den Retentionszeiten 8,75 und 9,98 eluiert wurde (s. Abb.46), wurde 1,5 Stunden bei 80°C einer Säurebehandlung mit 20%iger Trifluoressigsäure unterzogen. Dadurch wurde die Polysaccharid-Kette abgespalten und die PTC-Aminosäure in das entsprechende Phenylhydantoinderivat konvertiert (PTC-Asparagin wird dabei zu PTH-Asparaginsäure desamidiert). Durch nachfolgende Äthylacetatextraktion wurde eine Trennung in eine wässrige und eine organische Phase bewirkt.

In der wässrigen Phase wurde durch Aminosäureanalyse ohne vorherige Hydrolyse Glukosamin nachgewiesen.

Die in der organischen Phase enthaltene PTH-Aminosäure wurde durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie in einem isokratischen System (s. Abb.48) als PTH-Asparaginsäure identifiziert. Als Referenz diente PTH-Asparaginsäure. Wie in Abbildung 48 dargestellt, wurde die zum Vergleich eingesetzte PTH-Asparaginsäure zur Retentionszeit 3,42 eluiert, die PTH-Aminosäure der organischen Phase zur Retentionszeit 3,44. Die unmittelbar nach dem Start eluierten Peaks enthalten Lösungsmittel.

Somit konnte gezeigt werden, daß die Sequenzposition 3 der leichten Kette durch die Aminosäure Asparagin besetzt ist und daß dieser Asparaginrest eine Kohlehydratkette trägt (s. Abb.49). Da in der schweren Kette kein Kohlehydrat nachgewiesen werden konnte, stellt dieser Asparaginrest wahrscheinlich die Kohlehydratbindungsstelle für den gesamten Zucker des Akrosinmoleküls dar.

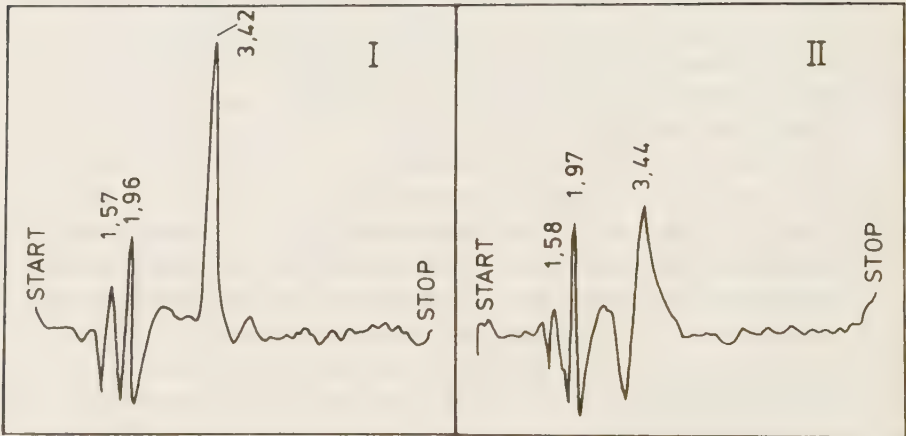


Abb.48 Hochdruckflüssigkeitschromatographie an einer reversed-phase RP 18-Säule in einem isokratischen System zur Identifizierung der in der organischen Phase enthaltenen PTH-Aminosäure

Lösungsmittel: 78% 0,01 M Natriumacetat, pH 4,9,
22% Acetonitril
Probe links: PTH-Asparaginsäure als Referenz in
Äthylacetat
Probe rechts: organische Phase mit nachzuweisender
PTH-Aminosäure
Auftragsvolumen: 200 µl
Durchflußgeschw.: 1,5 ml/min
Detektion: 210 nm (0,025 AUFS)

Spaltung der Disulfidbrücken freigesetzten zweiten Polypeptidkette entsprechen würde. Durch Aminosäure- und Sequenzanalyse wurde nachgewiesen, daß es sich bei der zweiten Kette des Akrosinmoleküls um ein im Vergleich zur schweren Kette kleines Peptid mit einem Proteinanteil von MG ca. 3 000 handelt. Da die leichte Kette also nur ca. 1/10 so groß ist wie die schwere Kette, muß sie zum Nachweis in der SDS-Gelelektrophorese um ein 10-faches angereichert werden, um eine ausreichende Färbung zu erzielen. Außerdem neigen Kohlehydrat-tragende Polypeptide dazu, diffuse, schlecht sichtbare Banden in der SDS-Elektrophorese zu ergeben. Dadurch wurde die leichte Kette möglicherweise in der SDS-Gelelektrophorese des reduzierten Ausgangsmaterials übersehen, dessen MG nach Abspaltung der zweiten Polypeptidkette auch nur geringfügig kleiner wird.

Von der durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie in 2 Peaks eluierten reinen leichten Kette (s. D.2.2.2. und Abb.17) wurden nun zur weiteren Charakterisierung 50 µg in ein SDS-Gradientengel von 5 - 25% Polyacrylamid eingesetzt.

In Übereinstimmung mit der identischen Aminosäureanalyse und identischem N-Terminus zeigten die korrespondierenden Polypeptidketten jeweils eine einzelne Bande mit gleicher elektrophoretischer Mobilität (s. Abb.50). Die Abschätzung der Molekülgröße im Vergleich mit einer Anzahl von Eichproteinen ergab ein MG von 5 800, welches erheblich höher ist als das in D.4.3. errechnete MG von 4 200. Jedoch neigen Glykopolypeptide dazu, in der SDS-Gelelektrophorese ein höheres MG zu ergeben (Leach et al., 1980).



Abb.50 SDS-Gelelektrophorese (s. C.3.4.2.)
der in 2 Peaks eluierten leichten
Kette aus Abb.17

- 2 und 4 Referenzproteine II
1 leichte Kette, eluiert zur
Retentionszeit 21,88
3 leichte Kette, eluiert zur
Retentionszeit 23,96

D.4.8. Isoelektrische Fokussierung

Wie in den vorhergehenden Kapiteln dargestellt, wurde die leichte Kette in 2 Peaks von der "reversed-phase"-Säule eluiert (s. Abb. 17).

Beide Peaks waren identisch in der Aminosäureanalyse, Sequenzanalyse und der elektrophoretischen Mobilität.

Erstaunlicherweise ließ sich nur das zur Retentionszeit 23,96 eluierte Material mit einer nach Vesterberg (1971) durchgeführten Methode isoelektrisch fokussieren. Der Versuch wurde sowohl ohne als auch mit Harnstoffzusatz ausgeführt. Beide Male zeigte die zur Retentionszeit 23,96 eluierte leichte Kette einen PI von 4,9, während sich für die zur Retentionszeit 21,88 eluierte leichte Kette kein isoelektrischer Punkt bestimmen ließ. Möglicherweise beruht das unterschiedliche Fokussierungsverhalten der beiden korrespondierenden Polypeptidketten auf einer Heterogenität im Kohlehydratanteil.

D.4.9. Untersuchungen auf freie Sulfhydrylgruppen

Durch Aminosäureanalyse und Sequenzbestimmung war bekannt, daß in der leichten Kette zwei Cysteine enthalten sind. Da eine Trennung von schwerer und leichter Kette nur nach reduktiver Spaltung der Disulfidbrücken möglich ist (s. D.2.2.), muß mindestens ein Cystein der leichten Kette mit der schweren Kette Disulfid-verknüpft vorliegen. Um Aussagen über das zweite Cystein treffen zu können, wurde das native Akrosinmolekül auf freie Sulfhydrylgruppen untersucht.

Das Auftreten freier Sulfhydrylgruppen ist ein äußerst seltenes Vorkommnis in Polypeptidketten, da diese eine Störung der richtigen Faltung bewirken.

Es wurden folgende Versuche zur Bestimmung freier Sulfhydrylgruppen durchgeführt:

- 1) Natives Akrosin wurde mit Jodessigsäure carboxymethyliert ohne vorherige Reduktion der Disulfidbrücken (s. C.3.1.2.). Eine nach der Entsalzung durchgeführte Aminosäureanalyse zeigte kein S-Carboxymethylcystein.
- 2) Natives Akrosin wurde an aktivierter Thiolsepharose chromatographiert. Thiolgruppen enthaltende Lösungen werden kovalent an dieses Säulenmaterial gebunden, wobei sich ein gemischtes Disulfid bildet und werden nach Zugabe eines reduzierenden Agens (L-Cystein) wieder eluiert.

In Abbildung 51 ist das Elutionsprofil von nativem Akrosin an aktivierte Thiolsepharose dargestellt. Die eluierten Pools A und B wurden nach der Entsalzung durch Aminosäureanalyse und N-terminale Sequenzanalyse untersucht. In Pool A waren die bekannten N-Termini von schwerer und leichter Kette enthalten; die Aminosäureanalyse zeigte die bekannte Zusammensetzung des nativen Akrosins.

Pool B zeigte in der Aminosäureanalyse nur freies Cystein aus Puffer B. Offensichtlich sind im gesamten Akrosinmolekül keine freien Sulfhydrylgruppen enthalten, die Affinität zur aktivierten Thiolsepharose zeigen. Somit scheint auch das zweite Cystein der leichten Kette Disulfid-verknüpft mit der schweren Kette vorzuliegen.

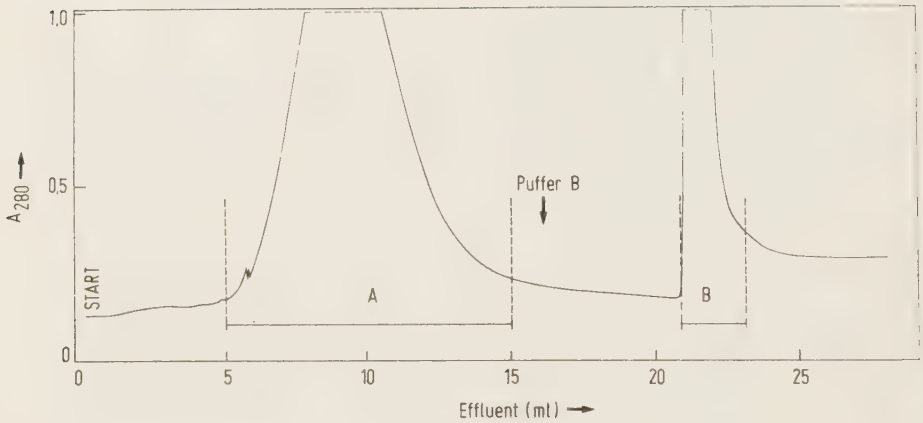


Abb.51 Chromatographie von nativem Akrosin an aktivierter Thiol-sepharose

Material: 2 mg (75 nMol) natives Akrosin in
2 ml Startpuffer
Säulendimensionen: 1 x 4 cm
Totalvolumen: 3,2 ml
Durchflußgeschw.: 6 ml/h
Startpuffer: 0,1 M Tris/HCl, 0,3 M NaCl, 1 mM EDTA,
pH 7,8
Puffer B: Startpuffer, versetzt mit 20 mM L-
Cystein/HCl, pH 7,8

Die Pools sind durch unterbrochene Linien gekennzeichnet und mit A und B bezeichnet.

D.4.10. Zusammenfassung

Nach reduktiver Spaltung der Disulfidbrücken konnte die leichte Kette des Akrosinmoleküls von der schweren Kette durch verschiedene Trennverfahren separiert werden.

In einem einzigen Sequenatorlauf wurde die Sequenz von 23 Aminosäuren bestimmt. Eine Fragmentierung in kleinere Bruchstücke war nicht erforderlich.

Eine weitere Charakterisierung ergab, daß der gesamte Kohlehydratanteil des Akrosinmoleküls am Asparaginsäurerest in Position 3 der leichten Kette verankert ist. Da freie Sulfhydrylgruppen im nativen Akrosinmolekül nicht vorkommen, liegen offensichtlich beide Cysteine der leichten Kette Disulfid-verknüpft mit der schweren Kette vor. Eine mögliche Homologie wird in Kapitel E.2.3. diskutiert.

D.5. Andere Akrosinformen

Wie in Kapitel B.5.8.1. dargestellt, soll Akrosin in einer inaktiven Speicherform als "Proakrosin" vorliegen. Für das Proakrosin werden von verschiedenen Autoren unterschiedliche Molekulargewichte angegeben, was mit der Bildung mehrerer Zwischenstufen im Verlauf der Aktivierung erklärt wird. Neben diesen multiplen, inaktiven "Proakrosinformen" wurde von einer tschechischen Arbeitsgruppe eine weitere aktive Form von Eberakrosin mit einem MG von 45 000 isoliert (Železná und Čechová, 1982). In Zusammenarbeit mit dieser Arbeitsgruppe wurde eine Charakterisierung dieser höhermolekularen aktiven Form vorgenommen. Vereinfachend wird im

Folgenden die höhermolekulare Form als α -Akrosin, die in dieser Arbeit charakterisierte Form als β -Akrosin bezeichnet.

D.5.1. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Elektrophorese in einem Gradientengel von 5 - 25% Polyacrylamid (s. Abb.52) ergab für α -Akrosin eine Hauptbande von MG ca. 45 000. Ein kleiner Teil dieser Akrosinpräparation zeigte die bekannte Bande der in dieser Arbeit charakterisierten Akrosinform mit MG 40 000.

D.5.2. Aminosäurezusammensetzung

Von β -Akrosin und α -Akrosin wurden unter identischen Bedingungen am selben Tag Aminosäureanalysen durchgeführt. Aus der Differenz beider Analysen wurde die Aminosäurezusammensetzung des zusätzlichen Sequenzabschnittes der höhermolekularen Form errechnet (s. Tab.13).

D.5.3. Zuckeranalyse

Der Kohlehydratgehalt wurde nach schwefelsaurer Hydrolyse in einem Kohlehydratanalysator bestimmt (s. C.3.7.).

In Tabelle 14 ist die Kohlehydratzusammensetzung von α -Akrosin angegeben und darunter zum Vergleich diejenige von β -Akrosin.

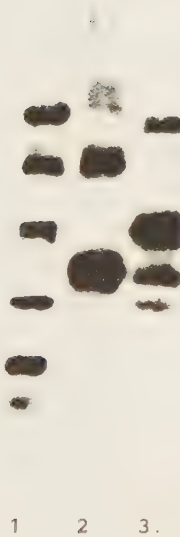


Abb.52 SDS-Gelelektrophorese (s. C.3.4.2.)
von Akrosin MG 40 000 und Akrosin
MG 45 000

- 1 Referenzproteine I
- 2 Eberakrosin MG 40 000 (β -Akrosin)
- 3 Eberakrosin MG 45 000 (α -Akrosin)

Tab.13 Aminosäureanalysen von α -Akrosin und β -Akrosin

Aminosäure	R e s t e				
	β -Akrosin		α -Akrosin		$\Delta\alpha - \beta$
	Akrosin MG 40 000 (a)	(b)	Akrosin MG 45 000 (a)	(b)	
Asp	24,5	25	28,2	28	3
Thr	19,6	20	22,5	22	2
Ser	17,8	18	21,7	22	4
Glu	27,0	27	32,8	33	6
Pro	37,2	37	65,3	65	28
Gly	33,9	34	37,3	37	3
Ala	20,0	20	26,3	26	6
Cys	7,7	8	7,9	8	-
Val	26,8	27 ⁺	31,2	31 ⁺	4
Met	6,1	6	6,3	6	-
Ile	17,1	17	18,8	19	2
Leu	24,6	25	29,4	29	4
Tyr	9,9	10	11,2	11	1
Phe	10,5	11	14,3	14	3
Lys	15,9	16	19,2	19	3
His	6,7	7	8,1	8	1
Arg	27,0	27	30,0	30	3
Trp	n.b.	7,5 ⁺⁺	n.b.	7,5 ⁺⁺⁺	n.b.
GluNac	5,4	5	1,1	1	-
Total		340		413	73 ⁺⁺⁺⁺

- + Wert nach 72 h Hydrolyse
 ++ aus der Sequenzanalyse
 +++ aus der Sequenzanalyse von β -Akrosin übernommen
 ++++ ohne Tryptophan
 (a) berechnete Aminosäurereste/Mol Protein
 (b) ganzzahlige Werte
 n.b. nicht bestimmt

Tab. 14 Kohlenhydratzusammensetzung von Akrosin mit MG 45 000 und MG 40 000

Glykoprotein	NANA Mol/Mol		GalNAc Mol/Mol		GlcNAc Mol/Mol		Man		Fuc		Gal		Glc		Gesamt
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	
Eberakrosin MG 45 000 = -Akrosin	0	0	2,1	2	1,1	1	3,5	3	0,8	1	0,3	0	1,4	1	3,29
Eberakrosin MG 40 000 = B-Akrosin	0	0	0	0	5,4	5	2,4	2	0,7	1	0,83	1	0	0	3,75

Im Gegensatz zu β -Akrosin wurden in α -Akrosin zwei Amino Zucker gefunden, nämlich Glukosamin und Galaktosamin. Der Gehalt an Glukosamin ist jedoch bei der höhermolekularen Form deutlich niedriger als im Akrosin MG 40 000. Der Gesamtkohlehydratanteil liegt mit 3,29 Gew.% etwas unter dem von β -Akrosin mit 3,75 Gew.%. Man muß jedoch berücksichtigen, daß im Verlauf der unterschiedlichen Isolierungsschritte auch die Kohlehydratketten unterschiedlich abgebaut wurden.

D.5.4. N-terminale Sequenzanalyse

Ein automatischer N-terminaler Abbau von 4 Schritten zeigte die bekannten 2 Sequenzen von β -Akrosin (s. Abb.53). Daraus kann man schließen, daß der zusätzliche Sequenzabschnitt der höhermolekularen Form nicht am N-Terminus lokalisiert ist.

- | |
|-----------------------|
| 1. Schritt: Val , Arg |
| 2. Schritt: Val , Asp |
| 3. Schritt: Gly |
| 4. Schritt: Gly , Ala |

Abb.53 N-terminale Aminosäuresequenz
von α -Akrosin

D.5.5. Autoproteolytische Umwandlung von α -Akrosin in β -Akrosin

Aus den Vorarbeiten von Železná und Čechová (1982) war bekannt, daß das höhermolekulare α -Akrosin nur im sauren Bereich stabil ist. Bei höheren pH-Werten als pH 4 bildet sich aus der α -Form durch Autodigestion die niedermolekulare β -Form.

Dieses Autoproteolyseverhalten wurde im analytischen Maßstab in Abhängigkeit der Reaktionszeit getestet und das Ergebnis durch SDS-Gelelektrophorese visualisiert. Unter den gewählten Bedingungen (s. C.3.10) konnte man ersehen, daß nach 60 Minuten 50% von α -Akrosin in die β -Form übergegangen waren und nach 4 Stunden alles α -Akrosin in β -Akrosin proteolysiert war (s. Abb.54). Das zusätzlich entstandene Bandenmuster entspricht in etwa dem bekannten Pattern der Autoproteolysebruchstücke der β -Akrosinform (s. Abb.14 und Abb.24).

Davon abweichend ist eine Bande mit MG 8 000 ersichtlich, die dem bei der Autoproteolyse freigesetzten zusätzlichen Sequenzabschnitt der höhermolekularen Form entsprechen könnte.

D.5.6. Isolierung des zusätzlichen Sequenzabschnittes

Von der tschechischen Arbeitsgruppe wurde unter den in C.3.10. angegebenen Bedingungen ein Proteolysegemisch im präparativen Maßstab hergestellt; die Proteolyse war durch Zugabe von Diisopropylfluorophosphat gestoppt und das Proteolysegemisch nach Dialyse lyophilisiert worden. Diese Präparation wurde uns zur Auftrennung und Charakterisierung der Proteolysekomponenten übergeben. Eine erste Charakterisierung des Proteolysegemisches durch SDS-Gelelektrophorese ergab, daß weniger als 50% von α -Akrosin in die β -Form übergegangen waren (s. Abb.55).

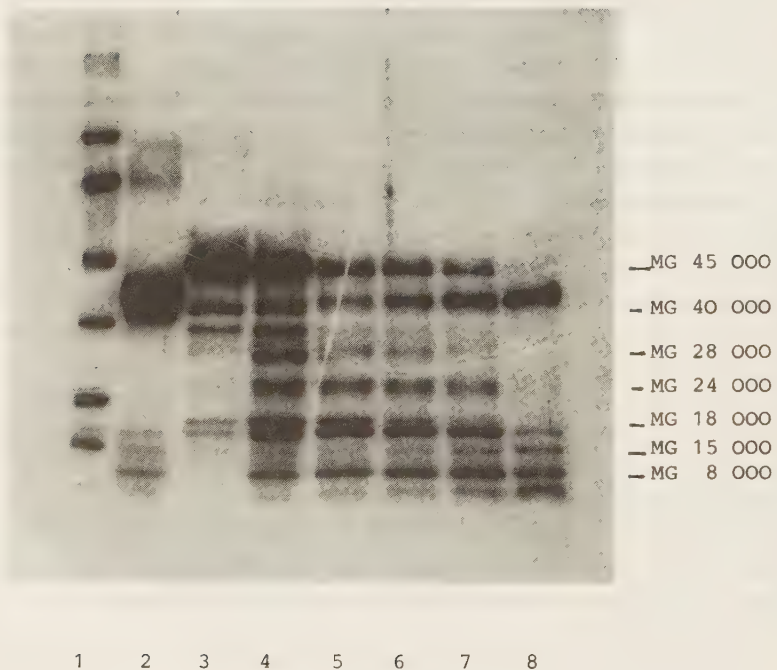


Abb.54 SDS-Gelelektrophorese (s. C.3.4.2.), Autoproteolyse von α -Akrosin zu β -Akrosin, Digestion bei pH 6,8, RT

- 1 Referenzproteine I
- 2 β -Akrosin
- 3 α -Akrosin, Proteolyse nach 1 min
- 4 α -Akrosin, Proteolyse nach 10 min
- 5 α -Akrosin, Proteolyse nach 30 min
- 6 α -Akrosin, Proteolyse nach 60 min
- 7 α -Akrosin, Proteolyse nach 2 h
- 8 α -Akrosin, Proteolyse nach 4 h

Alle Proben wurden vor der Gelelektrophorese reduziert.

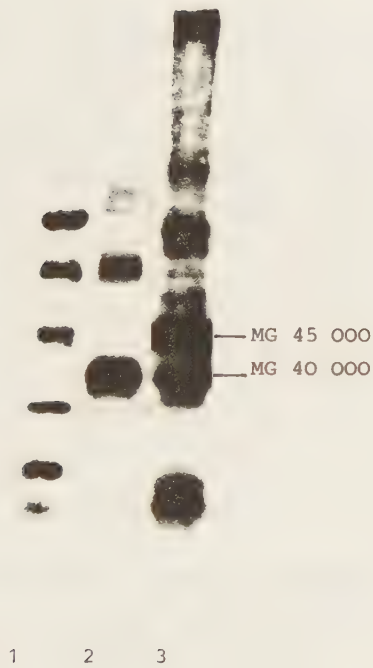


Abb.55 SDS-Gelelektrophorese (s. C.3.4.2.)

- 1 Referenzproteine I
- 2 β -Akrosin
- 3 Proteolysegemisch aus
Kapitel D.5.6.

Zur Isolierung des bei der proteolytischen Umwandlung von α -Akrosin in β -Akrosin freiwerdenden Sequenzabschnittes wählten wir eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie an zwei hintereinandergeschalteten Ultropac-TSK-Säulen von LKB (s. C.2.2.), da diese Säulen auf Grund der bisher gesammelten Erfahrungen sehr gut für die chromatographische Trennung hydrophober Proteinfragmente geeignet erschienen. Unter gleichen Chromatographiebedingungen wurden β -Akrosin (MG 40 000) und im Anschluß daran das Proteolysegemisch, bestehend aus α -Akrosin (MG 45 000), β -Akrosin (MG 40 000) und dem bei der Umwandlung der einen in die andere Form freiwerdenden Prolin-reichen Peptid an diesem Säulentandem chromatographiert. In Abbildung 56 und 57 sind die Elutionsprofile wiedergegeben.

D.5.6.1. Charakterisierung der Pools der TSK-Chromatographie

Die isolierten Komponenten wurden durch SDS-Gelelektrophorese und Aminosäureanalyse charakterisiert.

Beim Vergleich der beiden in Abbildung 56 und 57 dargestellten Chromatographien fällt Pool C₂ im Elutionsprofil des Proteolysegemisches auf (s. Abb.57), der im Chromatogramm von β -Akrosin fehlt (s. Abb.56). Das in diesem Pool enthaltene Material war gerade ausreichend, um eine Aminosäureanalyse durchzuführen. Diese ist in Tabelle 15 wiedergegeben. Zum Vergleich dazu sind die aus der Differenz der Analysen von α - und β -Akrosin errechneten hypothetischen Werte angegeben (s. Tab.13).

Aus der Aminosäureanalyse ist ersichtlich, daß in Pool C₂ ein Prolin-reiches Fragment eluiert wurde, dessen Aminosäurezusammensetzung sehr gut übereinstimmt mit dem für den zusätzlichen Sequenzabschnitt der höhermolekularen Form errechneten.

Die Aminosäureanalyse zeigte außerdem, daß die Elutionsausbeute dieses Fragments sehr gering ist. Das Material war nicht ausrei-

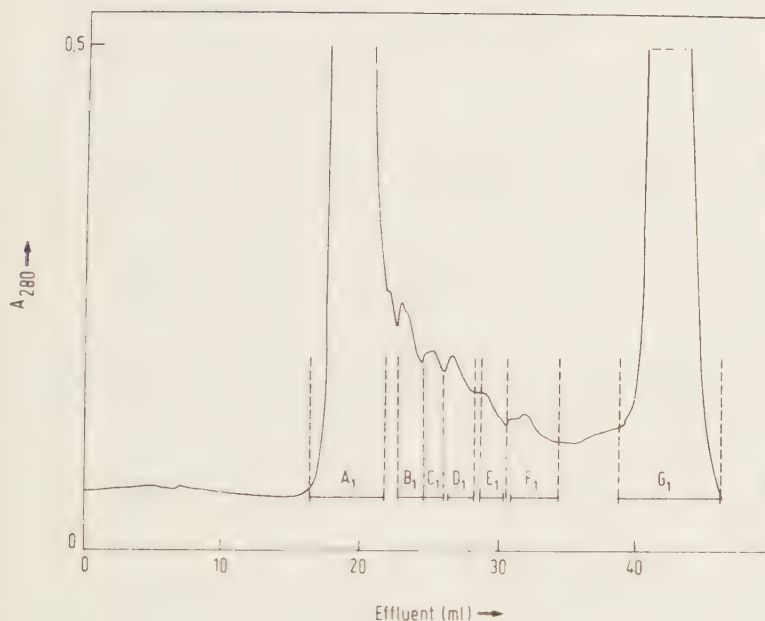


Abb.56 Chromatographie von β -Akrosin (MG 40 000) an zwei hintereinandergeschalteten Ultro-Pac-TSK-Säulen in 0,04% Trifluoressigsäure

Material:	1,5 mg (37,5 nMol) natives β -Akrosin in 250 μ l 0,04% TFA
Säulen:	Ultro-Pac-TSK-G 2000SW (10 ± 2 u)
	Ultro-Pac-TSK-G 3000SW (10 ± 2 u)
	Vorsäule: TSK-GSWP (10 ± 2 u)
Totalvolumen:	80 ml
Durchflußgeschw.:	6 ml/h

Die Pools sind durch unterbrochene Linien gekennzeichnet und mit A₁ bis G₁ bezeichnet.

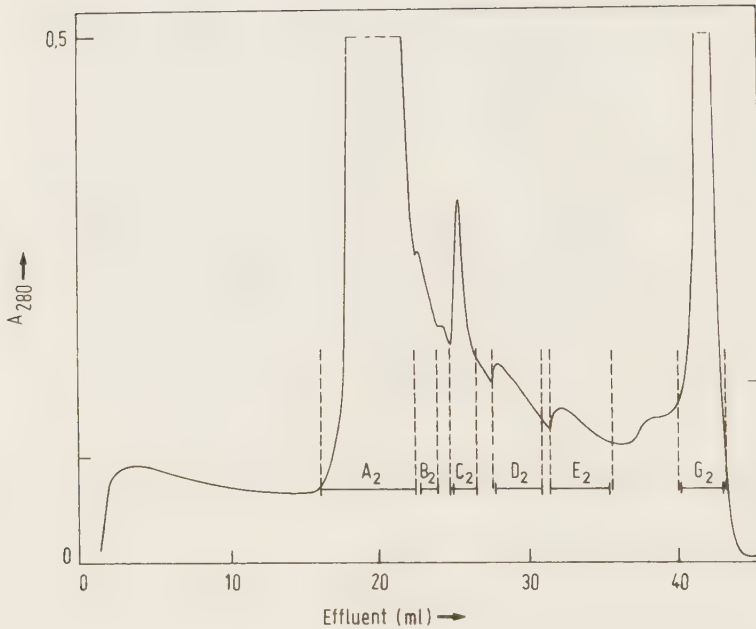


Abb.57 Chromatographie des Proteolysegemisches aus Kap. D.5.7. an zwei hintereinandergeschalteten Ultro-Pac-TSK-Säulen in 0,04% Trifluoressigsäure

Material:	Proteolysegemisch, das aus 1,5 mg (33 nMol) α -Akrosin (MG 45 000) erhalten wurde	
Säulen:	Ultro-Pac-TSK-G	2000SW ($10 \pm 2 \mu$)
	Ultro-Pac-TSK-G	3000SW ($10 \pm 2 \mu$)
	Vorsäule: TSK-GSWP	($10 \pm 2 \mu$)
Totalvolumen:	80 ml	
Durchflußgeschw.:	6 ml/h	

Die Pools sind durch unterbrochene Linien gekennzeichnet und mit A₂ bis G₂ bezeichnet.

Tab.15 Aminosäureanalyse des Proteinmaterials aus Pool C₂
(s. Abb.57)

Amino- säure	R e s t e		hypothetische Werte aus Tab.13 $\Delta\alpha - \beta$
	Material aus Pool C ₂ (a)	(b) ²	
Asp	4,3	4	3
Thr	2,7	3	2
Ser	4,9	5	4
Glu	7,0	7	6
Pro	26,6	27	28
Gly	3,8	4	3
Ala	6,1	6	6
Cys	-	-	-
Val	3,8	4 ⁺	4
Met	-	-	-
Ile	1,7	2	2
Leu	4,1	4	4
Tyr	0,9	1	1
Phe	3,0	3	3
Lys	3,4	3	3
His	0,5	1	1
Arg	3,0	3	3
Trp	n.b.	-	n.b.
GluNac	-	-	-
Total		77	73

⁺ Wert nach 72 h Hydrolyse
(a) berechnete Aminosäurereste/Mol Protein
(b) ganzzahlige Werte
n.b. nicht bestimmt

reichend, um eine weitere Charakterisierung durch SDS-Gelelektrophorese und N-terminale Sequenzanalyse vornehmen zu können.

Die SDS-Gelelektrophorese zeigte für das Material von Pool A₁ ein MG von 40 000 und für Pool A₂ ein MG von 45 000.

Eine N-terminale Sequenzanalyse von 4 Schritten zeigte in beiden Pools die bekannten zwei Sequenzen von schwerer und leichter Kette (s. D.1.4.).

Alle übrigen Pools zeigten kein Proteinmaterial.

D.5.7. Zusammenfassende Aussagen über die Lokalisation des zusätzlichen Sequenzabschnittes der höhermolekularen Akrosinform

Bei der Autodigestion von α -Akrosin zu β -Akrosin wird ein Prolin-reicher Sequenzabschnitt des Moleküls abgespalten. Dieser enthält ca. 70 Aminosäurereste, wobei der Prolingehalt ca. 34% beträgt. Da die Umwandlung der einen in die andere Form ohne vorherige reduktive Spaltung der Disulfidbrücken erfolgt, kann man ausschließen, daß dieser Sequenzabschnitt über eine Disulfidbrücke gebunden ist. Die Aminosäureanalyse zeigte kein Cystein und bestätigte somit diese Annahme.

Da die höhermolekulare Form N-terminal identisch ist mit der Akrosinform vom MG 40 000 (s. D.1.4. und D.5.4.), kann dieser Prolin-reiche Sequenzabschnitt nicht am N-Terminus lokalisiert sein. Die Möglichkeit, daß dieses Fragment aus dem Mittelteil des Moleküls freigesetzt wird, kann ausgeschlossen werden, da in der SDS-Gelelektrophorese des Proteolysegemisches (s. Abb. 55) keine entsprechenden Fragmente nachgewiesen werden können. Somit kann angenommen werden, daß der zusätzliche Prolin-reiche Sequenzabschnitt am C-Terminus der schweren Kette lokalisiert ist.

E. DISKUSSION

E.1. Zur Sequenzaufklärung

Durch die Einführung des automatischen Edman-Abbaues ergab sich eine neue Strategie bei der Aufklärung von Proteinsequenzen. Statt einer vollständigen enzymatischen Hydrolyse in viele kleine Bruchstücke mit den daraus resultierenden Schwierigkeiten bei der Peptidisolierung und -zuordnung wurde eine Fragmentierung in verhältnismäßig wenige große Segmente angestrebt, die eine rasche Aufklärung längerer Teilsequenzen durch den automatischen Edman-Abbau ermöglichen sollten. Die Durchführung dieser Strategie war bei den Sequenzstudien am Eberakrosin insofern von Problemen begleitet, als die Gewinnung sequenatorgerechter Peptide durch verschiedene überlappende chemische und enzymatische Spaltungen auf Grund der offensichtlich sehr kompakten Struktur des Moleküls nur bedingt möglich war. Aus der Aminosäurezusammensetzung (s. Tab.1) geht hervor, daß der Prozentsatz an Prolin (10,97%), Valin (8%), Leucin (7,41%) und Glycin (10%) relativ hoch ist. Man kann daher annehmen, daß hydrophobe Wechselwirkungen zur besonderen Stabilität der Akrosinstruktur beitragen. Die folgenden Experimente sollen die Probleme bei der Fragmentierung des Akrosins verdeutlichen:

1. Die sehr spezifische chemische Spaltung an den Methioninen mit Bromcyan war sowohl am nativen als auch am denaturierten Akrosinprotein nur mit ca. 40%-iger Effektivität durchführbar (s. D.3.5.). Anstelle von sieben erwarteten sequenatorgerechten Fragmenten wurde ein heterogenes Spaltgemisch erhalten; die Isolierung und Zuordnung der resultierenden

Bruchstücke bereitete große Schwierigkeiten.

2. Die Spaltungsversuche mit Chymotrypsin und der Proteinase aus *Staphylococcus aureus* zeigten ebenfalls nur geringen Erfolg (s. D.3.7. und D.3.8.). Bei beiden Enzymen ist beschrieben, daß eine potentielle Spaltstelle mit einem benachbarten Prolinrest nicht angreifbar ist. Das häufige Vorkommen der Aminosäure Prolin im Akrosinmolekül spielt sicher eine entscheidende Rolle bei der Unzugänglichkeit für diese Proteinasen.
3. Die Spaltungsversuche mit BNPS-Skatol und N-Bromsuccinimid waren ebenfalls erfolglos.

Somit war eine enzymatische Hydrolyse in relativ kleine Fragmente unvermeidbar. Die durch tryptische Verdauung erhaltenen Fragmente waren größtenteils identisch mit den durch Autoproteolyse gewonnenen Fragmenten, so daß diese enzymatische Hydrolyse keine zusätzlichen Fragmente lieferte.

Eine weitere erhebliche Schwierigkeit bereitete die Isolierung und Reinigung der gewonnenen Peptide, die zum Teil schwer löslich waren, zur Aggregation neigten und stark an hydrophobe Oberflächen adsorbierten. Die damit verbundenen geringen Ausbeuten und schlechten Trennleistungen machten ein Arbeiten in 7 M Harnstofflösung erforderlich. Die anschließende Entsalzung der harnstoffhaltigen Protein- bzw. Peptidlösungen brachte erneute Materialverluste mit sich. Außerdem besteht in diesem System die Gefahr der Carbamylierung freier Aminogruppen durch den Cyanatgehalt der Harnstofflösungen. Durch die Anwendung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie eröffneten sich neue Möglichkeiten bei der Trennung hydrophober Peptide. Durch die auf hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Protein- bzw. Peptidmaterial und Säulenmaterial beruhenden Trennung an "reversed-phase"-Säulen gelang es, die aus den enzymatischen Hydrolysen resultierenden kleinen Fragmente mit besseren Ausbeuten rein zu eluieren.

Die Fertigstellung der Sequenz der schweren Kette hängt von der erfolgreichen Durchführung weiterer möglichst spezifischer Spaltungen ab, die die nötigen Überlappungsstellen liefern und somit die Einordnung der bereits gewonnenen Peptide in die Sequenz ermöglichen.

Die aus 23 Aminosäuren bestehende leichte Kette des Eberakrosinmoleküls konnte nach der Abtrennung von der schweren Kette (s. D.2.2.) in einem einzigen automatisierten Sequenatorlauf bestimmt werden.

E.2. Über die Homologie des Akrosins mit anderen Serinproteinasen

E.2.1. Allgemeine Bemerkungen

Auf der Suche nach Homologien wurde mit Hilfe des Computers ein Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Aminosäuresequenz von Akrosin mit den Sequenzen einiger anderer Serinproteinasen durchgeführt (Programm "Align", Dayhoff et al., 1983). Als Grundlage dafür dient die von Dayhoff et al. (1979) im "Atlas of Protein Sequence and Structure" verwendete Matrix zur Abschätzung von Mutationswahrscheinlichkeiten. Die Autoren haben die Art und Zahl der einzelnen Aminosäureaustausche, die von der natürlichen Selektion akzeptiert wurden, innerhalb einer ganzen Anzahl von Proteinfamilien zusammengestellt. Die innerhalb der einzelnen untersuchten Proteinfamilien resultierenden Matrizen der akzeptierten Punktmutationen (PAM, abgeleitet aus A-cccepted P-oint M-utation = eine einzige akzeptierte Mutation pro 100 Aminosäureresten eines Proteins) wurden zu einer Matrix zusammengefasst, die nun die Austauschigenschaften der einzelnen Aminosäuren untereinander unabhängig von den untersuchten Proteinfamilien widerspiegelt.

Mit Hilfe der verschiedenen ermittelten Austauschhäufigkeiten wurde eine Skala von relativen Mutabilitäten der einzelnen Aminosäuren aufgestellt. Dabei erwies sich Serin als die Aminosäure mit der höchsten, Tryptophan als jene mit der niedrigsten relativen Mutabilität.

Eine wichtige Rolle dafür, daß irgendwann in der Entwicklung zweier verwandter Proteine eine bestimmte Aminosäure gegen irgendeine andere Aminosäure ausgetauscht wird, spielt die Anzahl der Nucleotide eines Tripletcodons, die für diese Veränderung mutiert werden müssen. So finden sich durch Überlagerung von Mutationswahrscheinlichkeit und Selektionsdruck im allgemeinen jene Aminosäureaustausche am häufigsten, die nur die Veränderung eines Nucleotids erfordern und dabei zum Ersatz einer Aminosäure durch eine chemisch ähnliche Aminosäure führen (konservativer Austausch). Um die homologen Teilsequenzen zweier oder mehrerer Proteine einander optimal zuordnen zu können, ist die Einführung von Lücken (gaps) in einzelne Sequenzbereiche nötig. Das Auftreten eines solchen "Lückenereignisses" (gap event) in einander zugeordneten Sequenzen spiegelt einen wichtigen Typ von genetischen Ereignissen in der Entwicklungsgeschichte der entsprechenden Proteine wieder:

1. Die Insertion oder die Deletion von Nucleotidtriplets in die den jeweiligen Genen entsprechenden DNA-Bereiche und
2. die Annahme eines solchen verlängerten oder verkürzten Gens durch die natürliche Auslese.

Die Wahrscheinlichkeit von Deletionen oder Insertionen ist wesentlich geringer als jene von Aminosäureaustauschen (Dayhoff und Barker, 1972).

Für die Wahrscheinlichkeit des Austausches einer bestimmten Aminosäure gegen eine andere Aminosäure ist häufig die spezifische Rolle dieser Aminosäure für die Aufrechterhaltung der Struktur und der Funktion einer Gruppe homologer Proteine von Bedeutung. Die Wahrscheinlichkeit, daß Aminosäuren, die über ihre Rolle bei der

Faltung der Polypeptidkette hinaus eine besondere Funktion bei der Aufrechterhaltung gemeinsamer Merkmale innerhalb einer Proteinfamilie besitzen, einem Austausch unterliegen, ist wesentlich geringer als die durchschnittliche Mutationswahrscheinlichkeit. So ist zwar die relative Mutabilität des Serins die höchste aller Aminosäuren, die Mutation des Serinrestes 195 jedoch, der für die Familie der Serinproteinasen namensgebend ist, dürfte wegen des damit verbundenen Verlustes der enzymatischen Aktivität im Verlauf der Evolution zurückgewiesen worden sein.

E.2.2. Zuordnung der schweren Kette

Vier Sequenzabschnitte der schweren Kette des Akrosins wurden in den schematischen Abbildungen 58 bis 61 mit den entsprechenden Sequenzabschnitten einiger anderer Serinproteinasen verglichen. Die Bezifferung der Aminosäurepositionen folgt in diesen Schemen und den weiteren Erläuterungen der Numerierung der Reste des Chymotrypsinogens A.

Der N-terminale Sequenzabschnitt der schweren Kette (Pos.16 bis 62) zeigt ausgeprägte Ähnlichkeit mit den N-terminalen Sequenzen der zum Vergleich herangezogenen anderen Serinproteinasen (s. Abb.58). Eine hierauf gegründete Zuordnung der schweren Kette des Akrosins zum N-terminalen Bereich der Vergleichssequenzen, beginnend mit der Zuordnung des N-terminalen Valinrestes zur Pos.16 des Chymotrypsinogens A, wird durch die Identität von 25 Aminosäuren dieses Sequenzabschnittes mit den entsprechenden Positionen des Chymotrypsins bestätigt.

Die charakteristische N-terminale Sequenz Ile-Val von Chymotrypsin, Rindertrypsin und Thrombin ist wie bei Plasmin, der Elastase und dem bakteriellen Trypsin zu der Sequenz Val-Val verändert. Ein Austausch Val/Ile dürfte jedoch wegen des sehr ähnlichen Sei-

tenkettenaufbaus beider Aminosäuren kaum zu erheblichen Veränderungen der Enzymstruktur führen. Während Gly18 beim Chymotrypsin und beim Thrombin zu Asn bzw. Glu verändert ist, scheint Gly19, vermutlich auf Grund seiner fehlenden Seitenkette, von wesentlicher Bedeutung für die Struktur zu sein, da es in allen acht verglichenen Sequenzen enthalten ist.

Pro28, eine Aminosäure die in allen verglichenen Sequenzen vorhanden ist, könnte auf Grund der aufgehobenen freien Drehbarkeit der Peptidkette am α -C-Atom eine bestimmte Rolle bei der Faltung der Polypeptidkette zukommen. Der invarianten Position 28 folgt bis zur Position 33 eine Teilsequenz, die von nur wenigen, meist konservativen Aminosäureaustauschen gekennzeichnet ist. So enthalten alle verglichenen Enzyme außer der Elastase in der Pos.29 eine Aminosäure mit einer aromatischen Seitenkette. Der Methioninrest in Pos.30 kommt sonst nur noch im bakteriellen Trypsin vor. Alle anderen verglichenen Sequenzen enthalten in dieser Position die Aminosäure Glutamin. Zwischen der Pos.33, die mit Leucin bzw. Isoleucin (Kallikrein) wenig variabel ist, und dem nächsten Verankerungspunkt für die Zuordnung in der vollständig invarianten Sequenz Cys42-Gly43 ist die Anzahl der Aminosäuren der einzelnen Enzyme verschieden. So enthält Akrosin mit 13 Aminosäuren in diesem Bereich die meisten Reste (Chymotrypsin und Plasmin enthalten 8, Elastase 11, Thrombin 9, bakterielles Trypsin 3, Rindertrypsin 6 und Kallikrein 7 Aminosäurereste).

Wenn man diesen Sequenzabschnitt in das bekannte Raummodell des Trypsins hineinlegt, kann man sehen, daß dieser verlängerte Sequenzabschnitt des Akrosins einen "Loop" an der Oberfläche bildet. Den wahrscheinlichsten Anhaltspunkt für eine möglichst homologe Zuordnung der Aminosäuresequenzen in diesem Bereich bildet die Sequenz His40-Thr41 bei Akrosin, der die Sequenz His40-Phe41 des Chymotrypsins, Plasmins und Rindertrypsin und die Sequenz His40-Tyr41 des Kallikreins zugeordnet werden können. Die Wahrschein-

Akrosin	(Schwein)	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Chymotrypsin	(Rind)	<u>Val</u> - <u>Val</u> - <u>Gly</u> - <u>Gly</u> - <u>Met</u> - <u>Ser</u> - <u>Ala</u> - <u>Glu</u> - <u>Pro</u> - <u>Gly</u> - <u>Ala</u> - <u>Trp</u> - <u>Pro</u> - <u>Trp</u> - <u>Met</u> - <u>Val</u> -															
Plasmin	(Mensch)	<u>Ile</u> - <u>Val</u> - <u>Asn</u> - <u>Gly</u> - <u>Glu</u> - <u>Glu</u> - <u>Ala</u> - <u>Val</u> - <u>Pro</u> - <u>Gly</u> - <u>Ser</u> - <u>Trp</u> - <u>Pro</u> - <u>Trp</u> - <u>Gln</u> - <u>Val</u> -															
Elastase	(Schwein)	<u>Val</u> - <u>Val</u> - <u>Gly</u> - <u>Gly</u> - <u>Cys</u> - <u>Val</u> - <u>Ala</u> - <u>His</u> - <u>Pro</u> - <u>His</u> - <u>Ser</u> - <u>Trp</u> - <u>Pro</u> - <u>Trp</u> - <u>Gln</u> - <u>Val</u> -															
Thrombin	(Rind)	<u>Val</u> - <u>Val</u> - <u>Gly</u> - <u>Gly</u> - <u>Thr</u> - <u>Glu</u> - <u>Ala</u> - <u>Gln</u> - <u>Arg</u> - <u>Asn</u> - <u>Ser</u> - <u>Trp</u> - <u>Pro</u> - <u>Ser</u> - <u>Gln</u> - <u>Ile</u> -															
Trypsin (Streptomyces griseus)	(Rind)	<u>Ile</u> - <u>Val</u> - <u>Glu</u> - <u>Gly</u> - <u>Gln</u> - <u>Asp</u> - <u>Ala</u> - <u>Glu</u> - <u>Val</u> - <u>Gly</u> - <u>Leu</u> - <u>Ser</u> - <u>Pro</u> - <u>Trp</u> - <u>Gln</u> - <u>Val</u> -															
Trypsin	(Rind)	<u>Val</u> - <u>Val</u> - <u>Gly</u> - <u>Gly</u> - <u>Thr</u> - <u>Arg</u> - <u>Ala</u> - <u>Ala</u> - <u>Gln</u> - <u>Gly</u> - <u>Glu</u> - <u>Phe</u> - <u>Pro</u> - <u>Phe</u> - <u>Met</u> - <u>Val</u> -															
Pankreaskallikrein (Schwein)		<u>Ile</u> - <u>Val</u> - <u>Gly</u> - <u>Gly</u> - <u>Tyr</u> - <u>Thr</u> - <u>Cys</u> - <u>Gly</u> - <u>Ala</u> - <u>Asn</u> - <u>Thr</u> - <u>Val</u> - <u>Pro</u> - <u>Tyr</u> - <u>Gln</u> - <u>Val</u> -															
		<u>Ile</u> - <u>Ile</u> - <u>Gly</u> - <u>Gly</u> - <u>Arg</u> - <u>Glu</u> - <u>Cys</u> - <u>Glu</u> - <u>Lys</u> - <u>Asn</u> - <u>Ser</u> - <u>His</u> - <u>Pro</u> - <u>Trp</u> - <u>Gln</u> - <u>Val</u> -															

konserviert	<u>Ile</u> <u>Val</u> <u>Gly</u> <u>Gly</u> <u>Ala</u> <u>Gly</u> <u>Ser</u> <u>Pro</u> <u>Trp</u> <u>Gln</u> <u>Val</u>
invariant	<u>Gly</u> <u>Pro</u>

A (S)	32	33	34	35	36	37	38	38A	38B	38C	38D	38E	39	40	41	41A	41B	41C	41D	42	43
CA (R)	<u>Ser</u> - <u>Leu</u> - <u>Gln</u> - <u>Ile</u> - <u>Phe</u> - <u>Met</u> - <u>Tyr</u> - <u>His</u> - <u>Asn</u> - <u>Asn</u> - <u>Arg</u> - <u>Arg</u> - <u>Tyr</u> - <u>His</u> - <u>Thr</u> -																				
P (M)	<u>Ser</u> - <u>Leu</u> - <u>Gln</u> - <u>Asp</u> - <u>Lys</u> - <u>Thr</u> - <u>Gly</u> -																				
E (S)	<u>Ser</u> - <u>Leu</u> - <u>Arg</u> - <u>Thr</u> - <u>Arg</u> - <u>Phe</u> - <u>Gly</u> -																				
Th (R)	<u>Ser</u> - <u>Leu</u> - <u>Gln</u> - <u>Tyr</u> - <u>Arg</u> - <u>Ser</u> - <u>Gly</u> -																				
T (St)	<u>Met</u> - <u>Leu</u> -																				
T (R)	<u>Arg</u> - <u>Leu</u> -																				
K (S)	<u>Ala</u> - <u>Ile</u> - <u>Tyr</u> -																				
k	<u>Ser</u> <u>Leu</u>																				
j	<u>Ser</u> <u>Gly</u> <u>His</u> <u>Phe</u> <u>Cys</u> <u>Gly</u> <u>Cys</u> <u>Gly</u>																				

A (S)	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62
CA (R)	<u>Gly-Ile-Leu-Leu-Asn-Ser-His-Trp-Val</u>	<u>Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Phe-Lys-Asn-Lys</u>																	
P (M)	<u>Gly-Ser-Leu-Ile-Asn-Glu-Asn-Trp-Val</u>	<u>Val-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Gly-Val-Thr</u>																	
E (S)	<u>Gly-Thr-Leu-Ile-Ser-Pro-Glu-Trp-Val</u>	<u>Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Leu-Glu-Lys-Ser</u>																	
Th (R)	<u>Gly-Thr-Leu-Ile-Arg-Gln-Asn-Trp-Val</u>	<u>Met-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Val-Asp-Arg-Glu</u>																	
T (St)	<u>Ala-Ser-Leu-Ile-Ser-Asp-Arg-Trp-Val</u>	<u>Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Leu-Leu-Tyr-Pro</u>																	
T (R)	<u>Gly-Ala-Leu-Tyr-Ala-Gln-Asp-Ile-Val</u>	<u>Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Val-Ser-Gly-Ser</u>																	
K (S)	<u>Gly-Ser-Leu-Ile-Asn-Ser-Gln-Trp-Val</u>	<u>Val-Ser-Ala-Ala-His-Cys-Tyr-Lys-Ser-Gly</u>																	
	<u>Gly-Val-Leu-Val-Asn-Pro-Lys-Trp-Val</u>	<u>Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys-Lys-Asn-Asp-Asn</u>																	
k	<u>Gly</u>	<u>Leu Ile</u>																	
i								<u>Trp Val</u>	<u>Leu Thr</u>	<u>Ala Ala</u>	<u>His Cys</u>								
								<u>Val</u>		<u>Ala Ala</u>	<u>His Cys</u>								

Abb.58

Vergleich des Sequenzabschnittes von Position 16 bis Position 62 der schweren Kette des Akrosins mit dem entsprechenden Sequenzabschnitt verschiedener tryptinähnlicher Serinproteinasen

Konservierte Aminosäuren (k) sind in mindestens der Hälfte der verglichenen Sequenzen vorhanden.

Invariante Aminosäuren (i) sind während der Evolution getreu konserviert worden und müssen in allen Serinproteinasen vorhanden sein. Die Aminosäuren, die mit denen der Akrosinsequenz homolog sind, sind unterstrichen.

lichkeit, daß ein Histidinrest in den verschiedenen Sequenzen gemeinsam vorkommt, ist mit 20% außerordentlich hoch; dieser an sich deutlichen Homologie der Zuordnung steht jedoch das verhältnismäßig unwahrscheinliche Auftreten von Deletionen und Insertionen gegenüber, das die getroffene Zuordnung erforderlich macht.

Nach der invarianten Sequenz Cys42-Gly43-Gly44 (mit Ausnahme des Thrombins) folgt in der Pos.45 ein Austausch der polaren Aminosäure Serin bzw. Threonin bei Chymotrypsin, Plasmin, der Elastase, Thrombin und Rindertrypsin gegen eine unpolare Aminosäure bei den anderen Sequenzen.

In der Pos.46 enthalten alle verglichenen Sequenzen Leucin.

Mit Trp51 bis Cys58 folgt eine Teilsequenz, in der Aminosäureaustausche verhältnismäßig selten vorkommen. Trp51-Val52 ist in allen verglichenen Sequenzen erhalten. Beim Austausch des Leucinrestes in der Pos.53 gegen Valin bei Chymotrypsin und Rindertrypsin handelt es sich um eine verhältnismäßig oft beobachtete Einbasenmutation. Den Aminosäuren Threonin oder Serin in der Pos.54 folgt eine in allen verglichenen Proteinen vollständig invariante Sequenz Ala55-Ala56-His57-Cys58. Diese Sequenz von vier Aminosäureresten beinhaltet neben His57, das für die katalytische Aktivität aller Serinproteinasen von wesentlicher Bedeutung ist (s. E.4.) mit Cys58 auch einen strukturell wichtigen Rest, der mit dem invarianten Cysteinrest in Pos.42 den in allen Serinproteinasen vorkommenden "Histidindisulfidloop" bildet. Dieser ist wichtig für die Orientierung des Histidinrestes im aktiven Zentrum. Somit ist die vollständige Invarianz dieses Bereiches durch Struktur und Funktion der Serinproteinasen bedingt.

Die folgende Lücke in der Sequenz der schweren Kette des Akrosins von Pos.63 bis Pos.93 ist zwar durch sequenatorgerechte Peptide ausgefüllt, jedoch bleibt deren Aminosäuresequenz noch zu ermitteln.

Die Sequenzpositionen 94 bis 107 konnten auf Grund ausgeprägter Homologie wieder den Vergleichssequenzen zugeordnet werden (s. Abb.59). Mit Ausnahme des Kallikreins und der Elastase enthalten alle Vergleichssequenzen in der Pos.94 einen Tyrosinrest. Die Wahrscheinlichkeit des gemeinsamen Auftretens eines Tyrosinrestes in homologen Sequenzpositionen auf Grund gemeinsamer Abstammung beträgt im Vergleich zu ihrem homologen Auftreten auf Grund reinen Zufalls 14 zu 1. Der darauf begründeten Zuordnung des Tyr94 steht der Austausch der konservierten Aminosäure Asn95 gegen Valin gegenüber, der relativ unwahrscheinlich ist.

Als nächster sicherer Zuordnungspunkt erscheint nach einem relativ variablen Bereich der Rest Asp102, der sich innerhalb der nur wenig variablen Sequenz Asp102 bis Lys107 befindet. Der Rest 102, dem eine wesentliche Funktion bei der katalytischen Aktivität aller Serinproteinasen zukommt (s. E.4.), ist vollständig invariant. In den Pos.103 bis 105 sind beim Akrosin alle konservierten Aminosäuren erhalten, in der Pos.106 zeigt sich ein Ile/Leu-Austausch, der wie der Austausch Lys/Arg in Pos.107 nur die Mutation eines einzigen Nucleotids erfordert und somit häufig aufgefunden wird.

Problematisch erscheint die Zuordnung der Sequenzpositionen 108 bis 177, die auch innerhalb der anderen Vergleichssequenzen nur bedingt deutliche Ähnlichkeiten aufweisen. Da die schwere Kette des Akrosins um ca. 50% länger ist als die der homologen Serinproteinasen in der aktivierten Form, kommen in dieser Sequenzabschnitte vor, die den Vergleichssequenzen fehlen und die sich folglich nicht zuordnen lassen.

Aus den durch SDS-Gelelektrophorese ermittelten Molekulargewichten einiger Bruchstücke geht hervor, daß ein zusätzlicher Sequenzabschnitt in diesem Bereich lokalisiert sein muß. Auch diese Lücke ist zwar durch sequenatorgerechte Peptide ausgefüllt, deren Aufeinanderfolge in der Sequenz jedoch noch ermittelt werden muß.

1

Abb. 59

Durch ein autoproteolytisches Bruchstück ist die Sequenzfolge 178 bis 214 bekannt (s. Abb.60), die sich auf Grund offensichtlicher Homologie sehr gut den Vergleichsproteinen zuordnen läßt. Der Methioninrest in Pos.180, der für den in allen Vergleichsproteinen konservierten "Methionindisulfidloop" (Cys168-Cys182) namentgebend ist, wurde beim Akrosin, beim Plasmin und beim bakteriellen Trypsin gegen Asparagin bzw. Glutaminsäure ausgetauscht. Der Austausch Asn gegen Met ist relativ unwahrscheinlich (1%) und zeigt deutlich einen Unterschied zum gemeinsamen Stamm der Pankreasenzyme Trypsin, Chymotrypsin sowie Elastase und zu dem plasmatischen Enzym Thrombin.

Das zum Methionindisulfidloop gehörende invariante Cys182 ist auch beim Akrosin vorhanden; das korrespondierende Cys168 konnte bisher nicht bestimmt werden, jedoch ist anzunehmen, daß es auf Grund der Invarianz auch im Akrosinmolekül vorhanden ist.

Mit Asp189 liegt auch im Akrosinmolekül ein Aminosäurerest vor, der analog seiner Funktion bei den Trypsinen, beim Thrombin, Plasmin und Kallikrein von ausschlaggebender Bedeutung für die Primärspezifität dieser Enzyme für Substrate mit positiv geladener Seitenkette sein dürfte. Nach einem konservativen Ser/Thr-Austausch in der Pos.190 folgt in der Pos.191 ein invarianter Cysteinrest, der mit Cys220 den in allem Serinproteinasen enthaltenen "Serindisulfidloop" bildet.

Der Sequenzabschnitt Gly193 bis Pro198 zeigt in allen verglichenen Proteinsequenzen keinen einzigen Aminosäureaustausch. Da diese Teilsequenz den für die katalytische Aktivität der Serinproteinasen primär wesentlichen Rest Ser195 einschließt, dürfte diese Invarianz von der unmittelbaren Bedeutung dieser Reste für die Konformation des aktiven Zentrums dieser Enzyme herrühren. Dieser wenig variable Bereich erstreckt sich außer bei bakteriellem Trypsin und Thrombin noch bis Cys201.

Einem relativ variablen Sequenzabschnitt folgt in der Pos.211 bis 214 ein Bereich, der in allen verglichenen Proteinen nur wenige Veränderungen aufweist.

Als nächster sicherer Zuordnungspunkt erscheint Thr222, mit dem sich ein weiteres autoproteolytisches Bruchstück dem C-terminalen Bereich der Vergleichssequenzen zuordnen läßt (s. Abb.61).

Wie Chymotrypsin besitzt auch Akrosin die Sequenzfolge Thr222-Ser223, die konservierte Sequenzfolge Pro225 bis Thr229 ist auch im Akrosin getreu erhalten. Mit dem Valin in Pos.231 endet jedoch die Ähnlichkeit mit den Aminosäuresequenzen aller verglichenen Proteine und über den C-Terminus in Pos.245 dieser Vergleichssequenzen hinaus erstreckt sich beim Akrosin ein verlängerter C-terminaler Bereich, dessen genaue Sequenz bisher nicht bekannt ist; jedoch kann man bereits sagen, daß in diesem Bereich sehr viele Proline und andere hydrophobe Aminosäuren lokalisiert sind, die für die besonderen Eigenschaften dieser zellulären Proteinase verantwortlich sind.

E.2.3. Verwandtschaftsbeziehungen

Der in Kapitel E.2.2. durchgeführte Vergleich einzelner Aminosäurereste der schweren Kette des Akrosins mit den entsprechenden Sequenzpositionen anderer Serinproteinasen zeigt klar die enge strukturelle Verwandtschaft, was auf die gemeinsame Herkunft aus einem Vorläuferenzym mit trypsinähnlicher Spezifität schließen läßt (de Haen et al., 1975).

Das allgemeine Muster der Ähnlichkeiten unter den in Kapitel E. 2.2. aufgeführten Enzymen weist deutlich eine Reihe von Bereichen mit ausgeprägter Homologie auf, die von Regionen mit geringerem Homologiegrad unterbrochen sind.

Da im Akrosinmolekül zusätzliche Sequenzabschnitte vorkommen, die den anderen zum Vergleich herangezogenen Serinproteinasen fehlen,

A (S)	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242
	<u>-Thr</u>	<u>-Ser</u>	<u>-Arg</u>	<u>-Pro</u>	<u>-Gly</u>	<u>-Val</u>	<u>-Tyr</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Arg</u>	<u>-Val</u>	<u>-Ala</u>	<u>-Leu</u>	<u>-Ile</u>	<u>-Asp</u>	<u>-Leu</u>	<u>-Glu</u>	<u>-Leu</u>	<u>-Ala</u>	X	<u>-Leu</u>	<u>-Ile</u>
CA (R)	<u>-Thr</u>	<u>-Ser</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Pro</u>	<u>-Gly</u>	<u>-Val</u>	<u>-Tyr</u>	<u>-Ala</u>	<u>-Arg</u>	<u>-Val</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Ala</u>	<u>-Leu</u>	<u>-Val</u>	<u>-Asn</u>	<u>-Trp</u>	<u>-Val</u>	<u>-Gln</u>	<u>-Gln</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Leu</u>
P (M)	<u>-Pro</u>	<u>-Asn</u>	<u>-Lys</u>	<u>-Pro</u>	<u>-Gly</u>	<u>-Val</u>	<u>-Tyr</u>	<u>-Val</u>	<u>-Arg</u>	<u>-Val</u>	<u>-Ser</u>	<u>-Arg</u>	<u>-Phe</u>	<u>-Val</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Trp</u>	<u>-Ile</u>	<u>-Glu</u>	<u>-Gly</u>	<u>-Val</u>	<u>-Met</u>
E (S)	<u>-Thr</u>	<u>-Arg</u>	<u>-Lys</u>	<u>-Pro</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Val</u>	<u>-Phe</u>	<u>-Tyr</u>	<u>-Thr</u>	<u>-His</u>	<u>-Val</u>	<u>-Phe</u>	<u>-Arg</u>	<u>-Lys</u>	<u>-Leu</u>	<u>-Lys</u>	<u>-Trp</u>	<u>-Ile</u>	<u>-Asn</u>	<u>-Asn</u>	<u>-Val</u>
Th (R)	<u>-Asn</u>	<u>-Gly</u>	<u>-Lys</u>	<u>-Tyr</u>	<u>-Gly</u>	<u>-Phe</u>	<u>-Tyr</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Glu</u>	<u>-Val</u>	<u>-Ser</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Phe</u>	<u>-Ala</u>	<u>-Ser</u>	<u>-Ala</u>	<u>-Ile</u>	<u>-Ala</u>	<u>-Ser</u>	<u>-Ala</u>	<u>-Ala</u>
T (St)	<u>-Pro</u>	<u>-Gly</u>	<u>-Tyr</u>	<u>-Pro</u>	<u>-Gly</u>	<u>-Val</u>	<u>-Tyr</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Glu</u>	<u>-Val</u>	<u>-Ser</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Phe</u>	<u>-Ala</u>	<u>-Ser</u>	<u>-Ala</u>	<u>-Ile</u>	<u>-Ala</u>	<u>-Ser</u>	<u>-Ala</u>	<u>-Ala</u>
T (R)	<u>-Lys</u>	<u>-Asn</u>	<u>-Lys</u>	<u>-Pro</u>	<u>-Gly</u>	<u>-Val</u>	<u>-Tyr</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Lys</u>	<u>-Val</u>	<u>-Cys</u>	<u>-Asn</u>	<u>-Tyr</u>	<u>-Val</u>	<u>-Ser</u>	<u>-Trp</u>	<u>-Ile</u>	<u>-Lys</u>	<u>-Gln</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Ile</u>
K (S)	<u>-Ala</u>	<u>-Asn</u>	<u>-Lys</u>	<u>-Pro</u>	<u>-Ser</u>	<u>-Ile</u>	<u>-Tyr</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Lys</u>	<u>-Leu</u>	<u>-Ile</u>	<u>-Phe</u>	<u>-Tyr</u>	<u>-Leu</u>	<u>-Asp</u>	<u>-Trp</u>	<u>-Ile</u>	<u>-Asn</u>	<u>-Asn</u>	<u>-Thr</u>	<u>-Ile</u>
k		<u>Lys</u>	<u>Pro</u>	<u>Gly</u>	<u>Val</u>	<u>Tyr</u>	<u>Thr</u>		<u>Val</u>	<u>Ser</u>							<u>Trp</u>	<u>Ile</u>		<u>Ile</u>	
i																					

Abb. 61 Vergleich des Sequenzabschnittes Position 222 bis Position 242 der schweren Kette des Akroisins mit dem entsprechenden Sequenzabschnitt verschiedener trypsinähnlicher Serinproteinasen

können Ähnlichkeiten nur zwischen den allen Vergleichssequenzen gemeinsamen Sequenzbereichen festgestellt werden. Aus Tabelle 16 geht hervor, daß in den verglichenen Sequenzabschnitten die Homologie der schweren Kette des Akrosins zum Chymotrypsin und Rindertrypsin am deutlichsten ist (jeweils 46% Ähnlichkeit). 79% der im Verlauf der Evolution konservierten und alle invarianten Aminosäuren sind in diesen Sequenzabschnitten der schweren Kette des Akrosins erhalten geblieben.

Es ist bekannt, daß im Verlauf der Evolution nur diejenigen Aminosäuren konserviert wurden, die für die Funktion und die Konformation essentiell sind. Dies bedeutet bei der homologen Gruppe der Serinproteinasen, daß besonders die Sequenzbereiche um den N-Terminus und die Umgebung der für das aktive Zentrum bedeutsamen Aminosäuren His57, Asp102 und Ser195 konserviert wurden. Diese essentiellen Bereiche sind auch im Akrosinmolekül erhalten.

In Abbildung 62 ist ein evolutionärer Stammbaum der eukaryontischen Serinproteinasen und des bakteriellen Trypsins dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß die früheste Divergenz, die des bakterielle Trypsins, auf einer gesonderten Linie plaziert werden muß. Im Verlauf der zu den heutigen Serinproteinasen der Wirbeltiere führenden Entwicklung müssen sich zunächst die Enzyme der Blutgerinnungskaskade von den übrigen Serinproteinasen abgespalten haben (de Haen et al., 1975). Wesentlich später erfolgte eine weitere Genduplikation, wobei eine Abtrennung des Fibrinolyseenzym (Plasmin) vom gemeinsamen Stamm der Pankreasenzyme erfolgte. Für eine verhältnismäßig kurze Periode muß dieses duplierte Gen einem drastischen Wechsel unterworfen gewesen sein, währenddessen sich die Vorläufer der Chymotrypsine, der Elastase und des Kallikreins von Trypsin abspalteten. Wie in Kapitel B.2. dargestellt, ist Akrosin auch in phylogenetisch niederstehenden Invertebratenklassen nachgewiesen worden. Wenn man davon ausgeht, daß die Akrosine dieser Spezies nicht nur funktionelle,

Tab.16 Homologiebeziehungen zwischen den in Abb.58 - 61 verglichenen Sequenzabschnitten verschiedener trypsinähnlicher Serinproteinasen und der schweren Kette des Akrosins

Enzyme	ähnliche Reste von 124 vergli- chenen Resten	% identisch
Chymotrypsin A (Rind)	57	46
Trypsin (Rind)	57	46
Trypsin (streptomyces griseus)	55	44
Plasmin (Mensch)	55	44
Elastase (Schwein)	50	40
Thrombin (Rind)	46	37
Pankreaskallikrein (Schwein)	45	36
konserviert (von ins- gesamt 70)	55	79
invariant (von ins- gesamt 21)	21	100

sondern auch strukturelle Ähnlichkeit mit dem Vertebratenakrosin besitzen, muß man die mit besonderen Eigenschaften ausgestattete zelluläre Proteinase Akrosin auf einer gesonderten Entwicklungs-
linie plazieren, die sich in einem sehr frühen Stadium vom Stamm
der pankreatischen und plasmatischen Serinproteinasen abgetrennt
hat (Hypothese s. Abb.62).

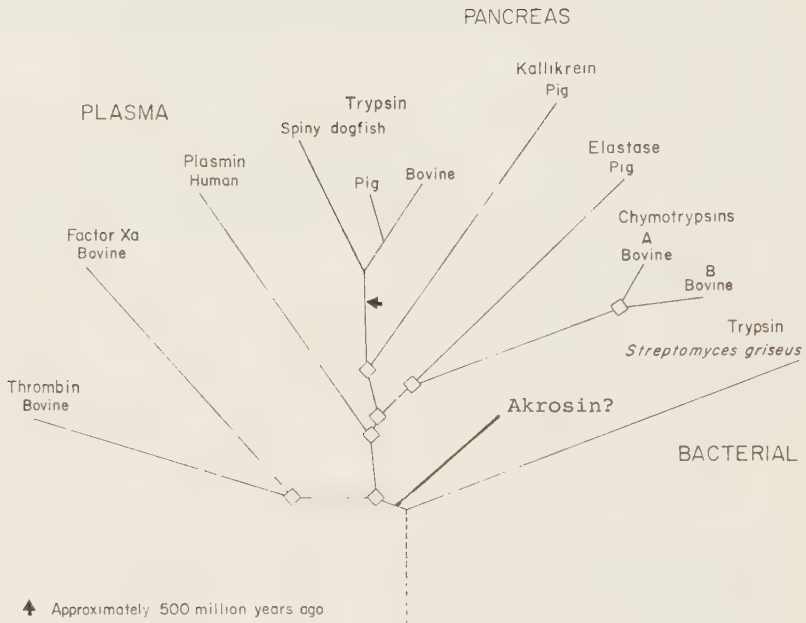


Abb.62 Evolutionärer Stammbaum der Serinproteinasen nach Young et al. (1978)

Genduplikationen sind durch Rauten (Diamonds) markiert. Die Platzierung von Akrosin ist spekulativ.

E.2.4. Die leichte Kette

Es ist bekannt, daß viele Proteine als inaktive Vorstufen bzw. als Zymogene synthetisiert werden und daß diese durch selektive enzymatische Spaltung von Peptidbindungen in die physiologisch aktive Form überführt werden (Neurath und Walsh, 1976). Ein Vergleich der Zymogensequenzen der Serinproteinasen zeigt auf den ersten Blick deutliche Unterschiede in Größe, Aminosäurezusammensetzung und Struktur, sodaß man eine Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorläufergen ausschließen möchte. Zum Beispiel besteht das Aktivierungspeptid von bovinem Trypsin nur aus sechs Aminosäureresten, während im anderen Extremfall das Fragment, das bei der Aktivierung von Prothrombin frei wird, größer ist als das Enzym Thrombin selbst. Wenn jedoch tatsächlich keine verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Proenzymsequenzen der verschiedenen Gruppen der Serinproteinasen besteht, könnte man folgern, daß die homologen aktiven Teile dieser Enzyme zuerst entstanden sind und daß die "Pro-Teile" unabhängig davon später angefügt wurden, indem sie der Genduplikation und der divergierenden Funktion folgten.

Beim Vergleich der leichten Kette des Akrosins mit den Proenzymsequenzen von Serinproteinasen verschiedener Funktionsbereiche fällt jedoch eine deutliche Homologie in der Umgebung eines Cysteinrestes auf, der mit einem korrespondierenden Cystein im aktiven Enzym eine Disulfidbrücke bildet (s. Abb.63).

Die deutlichste Ähnlichkeit besteht mit der Proenzymsequenz von Chymotrypsin, das mit 6 homologen Aminosäuren von insgesamt 15 verglichenen Positionen einen Homologiegrad von 40% aufweist. Sowohl Thrombin als auch der menschliche Gewbspfasminogenaktivator zeigen in ihren Proenzymteilen eine zur leichten Kette homologe Sequenzfolge eines Tetrapeptides (-Cy-Gly-Leu-Arg).

Akrosin	(Schwein)	Arg-Asp- ^{CHO} Abn-Ala-Thr-Cys-Asp-Gly-Pro-Cys-Gly-Leu-Arg-
Chymotrypsin	(Rind)	Cys-Gly-Val-Pro-
Thrombin	(Rind)	-Lys-Thr-Phe-Gly-Ala-Gly-Glu-Ala-Asp-Cys-Gly-Leu-Arg-
Gewebsplasminogenaktivator	(Mensch)	-Tyr-Cys-Asp-Val-Pro-Ser-Cys-Ser-Thr-Cys-Gly-Leu-Arg-
Plasmin	(Mensch)	-Pro-Gln-Cys-Ala-Ala-Pro-Ser-Phe-Asp-Cys-Gly-Lys-Pro-
Faktor X	(Rind)	-Ser-Cys-Val-Ser-Thr-Glu-Arg-Phe-Pro-Cys-Gly-Lys-Phe-
Faktor IX	(Rind)	-Ser-Cys-Glu-Pro-Ala-Val-Pro-Phe-Pro-Cys-Gly-Arg-Val-
Protease C	(Rind)	-Leu-Cys-Val-Ser-Lys-Val-Thr-Phe-Pro-Cys-Gly-Arg-Leu-



A (S)	-Phe-Arg-Gln-Lys-Leu-Glu-Ser-Gly-Met- - - - -Arg-Val-
C (R)	-Ala-Ile-Gln-Pro-Val-Leu-Ser-Gly-Leu-Ser- - - -Arg-Ile-
T (R)	-Pro-Leu-Phe-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Glu-(14 Reste)-Arg-Ile-
G (M)	-Gln-Tyr-Ser-Gln-Pro-Gln-Phe- - - - -Arg-Ile-
P (M)	-Gln-Val-Glu-Pro-Lys-Lys-Cys-Pro-Gly- - - -Arg-Val-
FX (R)	-Thr-Gln-Gly-Arg-Ser-Trp-Ala-Ile-His-(46 Reste)-Arg-Ile
FIX (R)	-Ser-Val-Ser-His-Ile-Ser-Lys-Lys-Leu-(36 Reste)-Arg-Val-
PC	-Gly-Lys-Arg-Met-Glu-Lys-Lys-Arg-Lys-(15 Reste)-Arg-Ile-

Abb. 63

Vergleich der leichten Kette des Akrosins mit Sequenzabschnitten der Proenzymsequenzen verschiedener anderer Serinproteinasen

Die Zahlen in Klammern geben die jeweilige Position in der entsprechenden Proenzymsequenz an. Homologe Aminosäuren sind unterstrichen. Der vertikale Pfeil markiert (bei Akrosin spekulativ).

Im Plasminogen kommt nicht nur die in allen Vergleichssequenzen vorhandene Sequenzfolge -Cys-Gly- vor, es enthält auch ebenso viele Aminosäuren wie die leichte Kette des Akrosins bis zur basischen Aminosäure Arginin, an der durch proteolytische Spaltung die Aktivierung der inaktiven Vorstufe erfolgt. Auch bei den Proenzymsequenzen der Blutgerinnungsfaktoren IX und X und der Protease C zeigt ein mit der leichten Kette gemeinsames Tripeptid -Pro-Cys-Gly- eine Homologie an. Die meisten der in Abbildung 63 zum Vergleich herangezogenen Proenzymsequenzen besitzen außer diesem Cystein in homologer Position, welches in allen Fällen mit dem aktiven Enzym disulfidverknüpft vorliegt, noch weitere Cysteine, die jedoch nur innerhalb der jeweiligen Proenzymteile Schwefelbrücken bilden. Nur der Proenzymteil des Plasmins bildet analog zur leichten Kette von Akrosin eine zweite Schwefelbrücke mit dem aktiven Enzym; jedoch kommen diese Cysteine nicht in homologen Positionen vor.

Auf Grund dieser Homologie kann man annehmen, daß es sich bei der leichten Kette des Akrosins um einen "Proenzymteil" des Enzyms handelt, der nach der zur Aktivierung notwendigen Spaltung einer Peptidbindung disulfidverknüpft mit der schweren Kette vorliegt (Fock-Nüzel et al., im Druck).

Auf Grund dieser festgestellten Homologie innerhalb der Zymogensequenzen verschiedener Serinproteinasen kann man a priori nicht ausschließen, daß die Aktivierungspeptide der Serinproteinasen verschiedene homologe Sequenzen repräsentieren, die die Produkte eines schnell imitierenden Vorläufergens darstellen.

E.3. Zur aktiven, höhermolekularen Akrosinform mit MG 45 000

In Kapitel D.5. wurde eine Charakterisierung einer höhermolekularen, aktiven Akrosinform vorgenommen. Durch autoproteolytische Abspaltung eines aus ca. 75 Aminosäuren bestehenden Peptides geht diese höhermolekulare Akrosinform (α -Akrosin) in die in dieser Arbeit beschriebene Akrosinform mit MG 40 000 (β -Akrosin) über. Eine reduktive Spaltung von Disulfidbrücken findet dabei nicht statt. Wie in D.5. dargelegt, wird die Lokalisation dieses Sequenzabschnittes am C-Terminus der schweren Kette postuliert.

Der hohe Prolingehalt dieses Fragmentes (35%) zusammen mit dem Vorkommen zahlreicher anderer hydrophober Aminosäuren, zeigt eine ungewöhnlich hohe Hydrophobizität dieses Sequenzabschnittes von α -Akrosin an. Die Prolinreste beeinflussen deutlich die Tertiärstruktur von Proteinen, da sie auf Grund der aufgehobenen freien Drehbarkeit der Peptidkette am α -C-Atom eine bestimmte Faltung der Kette bewirken. Die ungewöhnlich hohe Hydrophobizität dieses Sequenzabschnittes, verbunden mit der durch die Proline bedingten besonderen dreidimensionalen Struktur, lassen auf eine besondere Funktion schließen. Man könnte annehmen, daß die Funktion in einer Anheftung des Akrosin- bzw. Proakrosinmoleküls an der Oberfläche der akrosomalen Membranen durch hydrophobe Wechselwirkung besteht. Nach der Konversion von α - zu β -Akrosin, die mit der Abspaltung des hydrophoben Segments einhergeht, wird die Membranbindung aufgehoben und aktives β -Akrosin wird in das umgebende Medium entlassen, wo es in freier, ungebundener Form agieren kann (Zelezná und Cechová, 1982).

E.4. Über die Beziehung zwischen Struktur und Reaktivität

Die bisher bekannten dreidimensionalen Strukturen von Trypsin, Chymotrypsin, der Elastase und Kallikrein demonstrieren deutlich, daß die Tertiärstruktur einer Gruppe homologer Enzyme im Verlauf der divergierenden Entwicklung getreuer konserviert wird als die Primärstruktur (Stroud et al., 1974).

Röntgenkristallstrukturanalysen der Serinproteinasen haben gezeigt, daß das aktive Zentrum meist identisch ist (Stroud et al., 1975).

Wenn auch die Raumstruktur der Serinproteinase Akrosin noch nicht bekannt ist, dürfte für die folgende Diskussion die Annahme gerechtfertigt sein, daß vor allem die Bereiche mit funktioneller Bedeutung den Raumstrukturen der Enzyme der Trypsinfamilie entsprechen.

E.4.1. Aktives Zentrum

Wie man aus der Röntgenstrukturanalyse von Trypsin (Stroud et al., 1974) und Chymotrypsin (Birktoft und Blow, 1972) weiß, hat die primäre Substratbindungsstelle dieser Enzyme die Form einer tiefen Tasche, in der die Reste His57 und Ser195 liegen, die zusammen mit Asp102 das chemisch aktive Zentrum des Enzyms ausmachen.

Akrosin enthält die Aminosäuren dieses katalytischen Trias in identischen Positionen. Ein prinzipiell ähnlicher Wirkungsmechanismus wie der für Chymotrypsin und Trypsin beschrieben, dürfte daher auch beim Akrosin wirksam werden. Zwei Seiten dieser Substratbindungstasche werden vor allem durch die Sequenzbereiche 189 - 194 und 214 - 220 gebildet. Sie werden durch die Di-

sulfidbrücke 191 - 220 verknüpft (Serindisulfidloop) von der bei Akrosin bisher nur das Cystein 191 bestimmt werden konnte. Bei der Bindung des entsprechenden Substrates in dieser Tasche wurden eine Anzahl nicht polarer Wechselwirkungen zwischen Substrat und Enzym festgestellt. Für die Lösung einer Peptidbindung des Substrates wurde ein katalytischer Mechanismus vorgeschlagen, der ein "Ladungsübertragungssystem" (charge relay system) zwischen den Seitenketten Ser195, His57 und Asp102 beinhaltet (Cunningham 1957).

E.4.2. Primärspezifität

Die hohe Spezifität des Trypsins für positiv geladene Seitenketten als Substrate kann der γ -Carboxylgruppe von Asp189 zugeschrieben werden, die sich an der Seitenwand der Spezifitätstasche befindet (Steitz et al., 1969). Wie Trypsin enthält auch Akrosin in der Position 189 einen Asparaginsäurerest, so daß die Primärspezifität des Akrosins für die Hydrolyse insbesondere von Arginylbindungen die gleiche Erklärung finden dürfte.

E.4.3. Aktivierungsmechanismus

Der Vergleich der Raumstrukturen des Chymotrypsinogens A und des Chymotrypsins A hat gezeigt, daß der tryptischen Spaltung der Bindung Arg15-Ile16 bei der Aktivierung des Enzyms eine 180°-Drehung der Peptidkette in diesem Bereich folgt (Sigler et al., 1968). Dabei werden die bislang nach außen gerichteten Seitenket-

ten von Ile16 und Val17 ins Innere des Moleküls gedreht; die α -Aminogruppe von Ile16 nähert sich durch diese Drehung der im Inneren des Moleküls liegenden γ -Carboxylgruppe von Asp194, mit der sie ein Ionenpaar bildet. Die Bildung dieses Ionenpaares ist wesentlich für die Stabilisierung der Konformation, die eine Interaktion zwischen His57 und Ser195 ermöglicht, welche wiederum für die Ausbildung des aktiven Zentrums von Bedeutung ist (Neurath und Dixon, 1957).

Bei Akrosin ist die N-terminale Sequenz Ile16-Val17 des Chymotrypsins zu Val16-Val17 verändert; dieser Austausch Val/Ile dürfte wegen des sehr ähnlichen Seitenkettenaufbaus beider Aminosäuren jedoch unbedeutend sein. Wie alle Vergleichssequenzen enthält Akrosin in der Position 194 einen Asparaginsäurerest, so daß die beschriebene Ionenpaarbildung auch für die aktive Konformation des Akrosins gelten dürfte.

Der Mechanismus der Freisetzung von Akrosin aus seiner Zymogenform ist in Einzelheiten bisher nicht bekannt. Auf Grund der Homologie zu anderen Serinproteinasen sowohl im aktiven Enzym (schwere Kette) als auch im Proenzymbereich (leichte Kette), darf für "Pro-Akrosin" wohl ein ähnlicher Aktivierungsmechanismus angenommen werden, wie er z.B. beim Chymotrypsinogen beschrieben ist (Sigler et al., 1968).

In den bekannten Zymogen-Enzym-Konversionen erfolgt die Aktivierung der inaktiven Vorstufe durch selektive enzymatische Spaltung (limitierte Proteolyse) einer oder mehrerer Peptidbindungen an der Oberfläche oder in anderen flexiblen Regionen des Moleküls in einem einzigen Aktivierungsschritt oder in einer Aktivierungskaskade (Neurath 1975).

Die Aktivierung des Chymotrypsinogens erfolgt primär durch die Spaltung der Peptidbindung zwischen der basischen Aminosäure Arg15 und Ile16 (s. Abb.63). Das dadurch entstandene Zweikettenmolekül wird durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten (s. Abb.64). Die

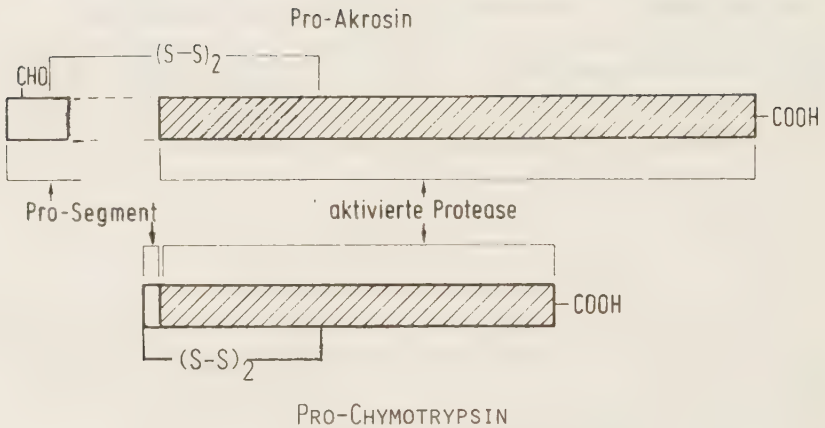


Abb.64 Akrosin- und Trypsinvorstufen

Spaltung ermöglicht eine Neuorientierung der entstandenen Polypeptidketten, sodaß funktionelle Bereiche (His57, Ser195) eine Konformation einnehmen können, die die Ausbildung des aktiven Zentrums ermöglicht und die in der Vorstufe nicht möglich ist.

Eine mögliche Struktur einer Akrosinvorstufe ist in Abbildung 64 dargestellt und zum Vergleich dazu diejenige der bekannten Vorstufe des Chymotrypsins. Ein analoger Aktivierungsmechanismus wie bei Chymotrypsinogen würde beim "Pro-Akrosin" durch die selektive Spal-

tung der Peptidbindungen zwischen dem C-terminalen Arginin der leichten Kette und dem N-terminalen Valin der schweren Kette zur Aktivierung führen. Da man jedoch die Sequenz dieser überlappenden Region nicht kennt, wäre auch denkbar, daß die Aktivierung stufenweise in einer Aktivierungskaskade verläuft, wobei nicht Disulfid-verknüpfte Aktivierungspeptide abgespalten werden. Der Proenzymbereich der leichten Kette bleibt nach erfolgter Aktivierung über eine bzw. zwei Disulfidbrücken mit dem aktiven Enzym verbunden.

Zusammenfassend kann man sagen, daß Akrosin alle Strukturmerkmale einer Serinproteinase besitzt. Jedoch zeigt es einen entscheidenden Unterschied zu den anderen Vertretern dieser Klasse von Enzymen (s. Abb.65): Die Polypeptidkette des aktivierten Akrosins (schwere Kette) ist erheblich länger als die der anderen bisher charakterisierten Serinproteinasen mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von MG ca. 25 000 im aktiven Teil. Die aus Abbildung 65 ersichtlichen Größenunterschiede werden nur durch die in der Größe erheblich variierenden Proenzymbereiche bewirkt.

Es ist anzunehmen, daß diese Insertionen und Extensionen in der schweren Kette des Akrosins die hydrophoben Membranbindungsstellen darstellen, die für Akrosin postuliert werden und die im Laufe der Evolution für die spezifische Funktion dieser zellulären Proteinase entwickelt wurden.

SERINE PROTEASES

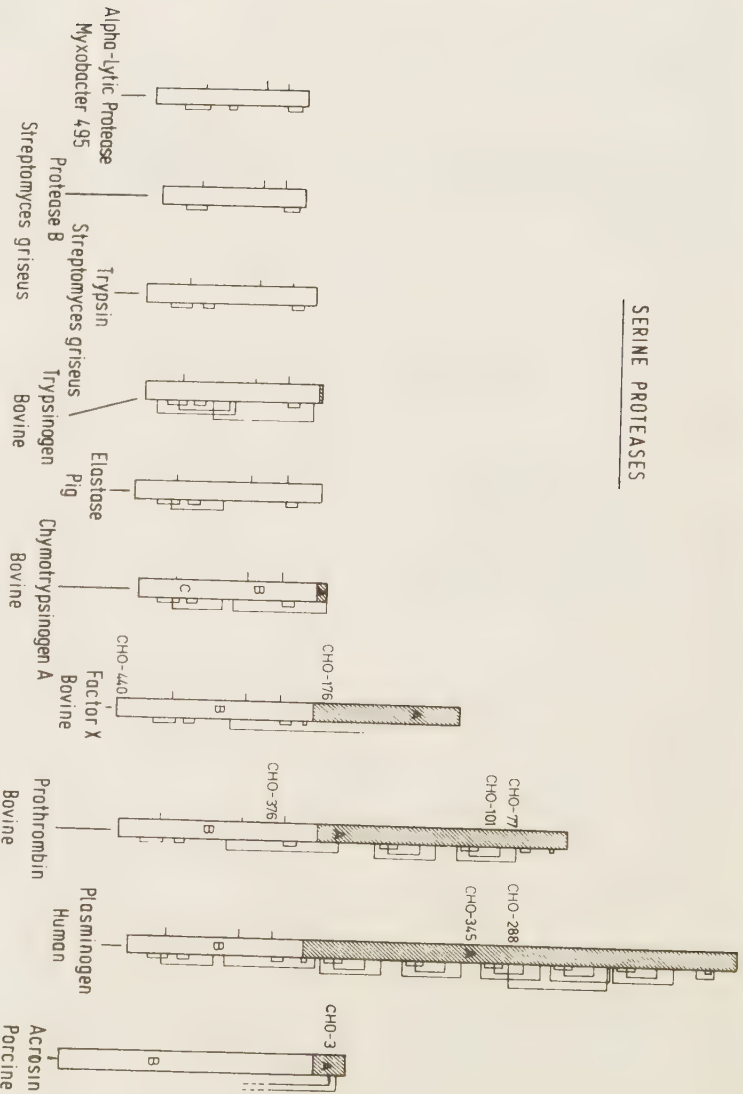


Abb. 65

Molekulare Architektur der Serinproteinasen nach der Darstellung aus dem Atlas of Protein Sequence and Structure (1978)

Die Proenzymbereiche sind schraffiert und mit "A" bezeichnet.

E.5. Klinische Aspekte

Da bisher keine echten Fertilitätsparameter existieren, bemühen sich Andrologen, durch die Bestimmung der Akrosinaktivität von Humanspermien zukünftig einen biochemischen Parameter zu etablieren, der mit der Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen eines Ejakulats korreliert. Die von Schill (1977) durchgeführten Untersuchungen an einem andrologischen Patientengut zeigten eine Korrelation zwischen der Akrosinaktivität und der Spermatozoendichte. Allerdings konnte bisher keine Fertilitätsstörung primär mit einer pathologischen Akrosinaktivität korreliert werden.

Von klinisch diagnostischer Bedeutung ist die Akrosinbestimmung vorläufig zur Sicherung der Diagnose "Globozoospermie", bei der sich infolge der fehlenden Akrosomenkappe auch kein Akrosin nachweisen läßt.

Vielversprechende Ansätze liegen jedoch in einem zweiten Aspekt, der gezielten antienzymatischen Kontrazeption.

Das Prinzip erscheint einfach: Durch gezielte Hemmung von Akrosin kann keine Penetration der Zona pellucida und somit keine Befruchtung erfolgen.

Drei Lösungsvorschläge existieren, die bisher experimentell überprüft wurden:

1. Der immunologische Ansatz

Durch Immunisierung von Schafen gegen heterologes Akrosin wurden zwar gute Antikörpertiter erreicht, auch Anti-Akrosin-Antikörper im uterinen und cervikalen Sekret nachgewiesen, eine signifikante Reduktion der Befruchtungsrate blieb jedoch aus (Diczfalusy, 1974). Der Grund hierfür besteht möglicherweise in der Unzugänglichkeit von Akrosin im intakten Akrosom; die Antikörper können die akrosomalen Membranen nicht passieren.

2. Das zweite Konzept besteht in der Auflösung von Spermatozoen-Membranen und damit auch der Solubilisierung von Akrosin. Diesem Prinzip folgen bereits etablierte lokale Kontrazeptiva, die durch Detergentien als Wirkstoffe spermizid wirken.
3. Das dritte Konzept basiert auf der spezifischen antienzymatischen Kontrazeption durch maßgeschneiderte Akrosininhibitoren (Müller-Esterl et al., 1983; Beyler und Zaneveld, 1982; Fritz et al., 1972). Der kritische Punkt dieses Prinzips besteht darin, daß die Inhibitoren durch die äußeren akrosomalen Membranen diffundieren müssen, um das Zielenzym zu erreichen (Schill et al., 1981). Diese Barriere überwinden nur wenige, bevorzugt niedermolekulare Inhibitoren wie NPGB, Trasylol und Guanidin-Derivate bei menschlichen Spermatozoen; bei Eberspermatozoen sind es darüber hinaus auch Amidine und Diamidine, die transmembranal diffundieren können. Generell erscheinen Spezies-spezifische Unterschiede in der Membranpermeabilität der Spermatozoen zu existieren, wobei die Eber-Akrosomenmembranen leichter penetrierbar erscheinen als die menschlichen Membranen.
Diejenigen Akrosininhibitoren, die die akrosomalen Membranen penetrieren konnten, waren entweder zu toxisch oder aber die für eine effektive Akrosinhemmung nötige lokale Konzentration konnte in vivo nicht innerhalb der männlichen oder weiblichen Genitalsekrete erreicht werden. Daher können diese Akrosininhibitoren bisher nicht als Antikonzeptivum in vivo angewandt werden (Schill et al., 1981).

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Allen, G.J. (1977) Evidence for the dissimilarity of Acrosin and pancreatic trypsin as revealed by a sensitive immuno-assay. J.Exp.Zool. 200, 185
- Aminoff, D. (1961) Methodes for the quantitative estimation of N-Acetyl-neuraminic acid and their application to hydrolysates of Sialomucoids. Biochem.J. 81, 384
- Austin, C.R. (1951) Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Austr.J.Sci.Res. 4, 581
- Austin, C.R. (1970) Sperm capacitation; Biological significance in various species. Adv.Biosci. 4, 5
- Bedford, J.M. (1968) Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit. Ann.J.Anat. 123, 239
- Begg, G.S., Pepper, D.S., Chesterman, C.N. and Morgan, F.J. (1978) Complete covalent structure of human β -thromboglobulin. Biochem. 17, 1739
- Beyler, S.A. and Zaneveld, L.J.D. (1979) The role of Acrosin in sperm penetration through human cervical mucus. Fertil.Steril. 32, 671
- Beyler, S.A. and Zaneveld, L.J.D. (1982) Antifertility activity of systemically administered proteinase (Acrosin) inhibitors. Contraception 26, 137
- Birktoft, I.J. and Blow, D.M. (1972) Structure of cristalline α -chymotrypsin. The atomic structure of tosyl- α -chymotrypsin at 2 Å resolution. J.Mol.Biol. 68, 187
- Blandau, R.J. (1973) Sperm transport trough the mammalian cervix: comparative aspects. In: The biology of the cervix (Blandau, R. J. and Moghissi, K.S., eds.) p. 285 - 304. Chicago: University of Chicago Press.

- Brandt, W.F., Edman, P., Henschen, A. und von Holt, C. (1976) Abnormal behaviour of proline in the isothiocyanate degradation. *Z.Physiol.Chem.* 357, 1505
- Brown, C.R. and Hartree, E.F. (1974) Distribution of a trypsin like proteinase in the ram spermatozoa. *J.Reprod.Fert.* 36, 195
- Brown, C.R. and Hartree, E.F. (1976) Effects of Acrosin inhibitors on the soluble and membrane bound forms of raw Acrosin and a reappraisal of the role of the enzyme in fertilisation. *Z.Physiol.Chem.* 357, 57
- Brown, C.R. and Hartree, E.F. (1976) An Acrosin inhibitor in ram spermatozoa that does not originate from the seminal plasma. *Z.Physiol.Chem.* 356, 1909
- Brown, C.R. and Harrison, R.A.P. (1978) The activation of Pro-acrosin in spermatozoa from ram, bull and boar. *Biochim.Biophys.Acta* 526, 202
- Buruiana, L.M. (1956) Sur l'activité hyaluronidasique et tryptique du sperme. *Naturwiss.* 43, 523
- Chang, M.C. (1951) Fertilizing capacity of rabbit spermatozoa deposited in the Fallopian tube. *Nature* 168, 697
- Croft, L.R. (1980) In: Introduction to protein sequence analysis. John Wiley & sons, LTD
- Cunningham, L.W. (1957) Proposed Mechanism of action of hydrolytic enzymes. *Science* 125, 1145
- DeHaen, C.H., Neurath, H. and Teller, D.C. (1975) The phylogeny of trypsin-related serine proteases and their zymogens. New methods for the investigation of distant evolutionary relationships. *J.Mol.Biol.* 95, 225
- Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. and Orcutt, B.C. (1978) A model of evolutionary change in proteins. In: Atlas of protein sequence and structure, Vol.5, Suppl. 3, 345. National Biomedical research foundation, Washington, D.C.

- Dayhoff, M.O., Barker, W.C. and Hunt, L.T. (1983) Establishing homologies in protein sequences. *Meth.Enzymol.* 91, 524
- Diczfalussy, E. (1974) Immunological approaches to fertility control. 7th Karolinska Symposium on Research Methods in Reproductive Endocrinology. *Acta Endocr., Suppl.* 194
- Drapeau, G.R. (1976) Protease from *Staphylococcus aureus*. *Meth. Enzymol.* 45, 469
- Edman, P. und Begg, G. (1967) A protein sequenator. *Eur.J.Biochem.* 1, 80
- Edman, P. und Henschen, A. (1975) In: Protein sequence determination (Needleman, S.B., ed.) 2nd edn., 232 - 279, Springer-Verlag, Berlin
- Eliasson, R. (1971) Standards for investigation of human semen. *Andrologia* 3, 49
- Elinson, R.R. (1974) A comparative examination of Amphibian sperm.proteolytic activity. *Biol.Reprod.* 11, 406
- Fink, E., Klein, G., Hammer, F., Müller-Bardorff, G. und Fritz, H. (1971) Protein proteinase inhibitors in male sex glands. In: *Proc.Int.Res.Conf. on Proteinase Inhibitors* (Fritz, H. und Tschesche, H., Hrsg.), Munich 1970, 225 - 235
- Fock-Nüzel, R., Lottspeich, F., Henschen, A., Müller-Esterl, W. und Fritz, H. (1980) N-terminal amino acid sequenced boar sperm Acrosin. *Z.Physiol.Chem.* 361, 1823
- Fontana, H., Vita, C. und Tonido, C. (1973) Selective cleavage of the single tryptophanyl peptide bond in horse heart Cytochrome C. *FEBS Lett.* 32, 139
- Fowler, A.V. und Zabin, I. (1978) Amino acid sequence of β -galactosidase XI. Peptide ordering, procedures and the complete sequence. *J.Biol.Chem.* 253, 5521

- Fritz, H., Förg-Brey, B., Fink, E., Meier, M., Schiessler, H., Schirren, G. (1972) Humanakrosin: Gewinnung und Eigenschaften. *Z. Physiol. Chem.* 353, 1943
- Fritz, H., Schiessler, H. und Schleuning, W.-D. (1972) Proteinases and proteinase inhibitors in the fertilization process: new concepts of control. *Adv. Biosci.* 10, 371
- Fritz, H., Schiessler, H., Schill, W.B., Tschesche, H., Heimbürger, N. und Wallner, O. (1975) Low molecular weight proteinase (Acrosin) inhibitors from human and boar seminal plasma and spermatozoa and human cervical mucus: isolation, properties and biological aspects. In: Reich, E., Rifkin, D. and Shaw, E. (eds.) "Proteases and biological control", 737 - 766, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Gaddum, P. and Blandau, R.J. (1970) Proteolytic reaction of mammalian spermatozoa on gelatin membranes. *Science* 170, 749
- Garner, D.L., Easton, M.P., Munson, M.E. and Doane, M.A. (1975) Immunfluorescent localization of bovine Acrosin. *J. Exp. Zool.* 191, 127
- Garner, D.L. and Easton, M.P. (1977) Immunfluorescent localization of Acrosin in Mammalian Spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 200, 157
- Goodpasture, J.C., Polakoski, K.L. and Zaneveld, L.J.D. (1980) Acrosin, Proacrosin and Acrosin inhibitor of human spermatozoa. Extraction, quantitation and stability. *J. Androl.* 1, 16
- Green, D.P.L. (1978) The activation of proteolysis in the acrosome reaction of guinea-pig sperm. *J. Cell. Sci.* 32, 153
- Gross, E. and Witkop, B. (1961) Specific cleavage of methionyl peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 83, 1510
- Gwatkin, R.B.L. (1977) Fertilization mechanism in man and mammals. Plenum press, New York, London
- Gwatkin, R.B.L., Wudl, L., Hartree, E.F. and Fink, E. (1977) Prevention of fertilisation by exposure of hamster eggs to soluble Acrosin. *J. Reprod. Fert.* 50, 359

- Hagenfeldt, K. (1972) Intrauterine contraception with the copper-T device. 1. Effect on trace elements in the endometrium, cervical mucus and plasma. Contraception 6, 37
- Hartley, B.S. (1960) Proteolytic enzymes. Ann.Rev.Biochem. 29, 45
- Hartree, E.F. and Srivastava, P.N. (1965) Chemical composition of the acrosomes of ram spermatozoa. J.Reprod.Fertil. 9, 47
- Henschen, A. und Edman, P. (1972) Large scale preparation of S-carboxymethylated chains of human fibrin and fibrinogen and the occurrence of γ -chain variants. Biochim.Biophys.Acta 263, 351
- Ho, I.J.L. and Meizel, S. (1976) Biochemical characterization of an avian spermatozoon Acrosin and comparison of its properties to those of bovine trypsin and mammalian Acrosins. Comp.Biochem. Physiol. 54 B, 213
- Hoshi, M., Numakunai, T. and Sawada, H. (1981) Evidence of participation of sperm proteinases in fertilization of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*: Effects of protease inhibitors Develop.Biol. 85, 156
- Houmard, J. and Drapeau, G.R. (1972) Staphylococcal protease, a proteolytic enzyme specific for glutamyl bonds. Proc.Nat.Acad. Sci. U.S.A. 69, 3506
- Kaspar, C.B. (1970) In: Protein sequence determination (Needleman, S.B. ed.) pp. 114 - 161, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Kettner, Ch., Springhorn, S. and Shaw, E. (1978) Inactivation of boar Acrosin by peptidyl-arginyl-chloromethanes. Z.Physiol. Chem. 359, 1183
- Kostka, V. and Carpenter, F.H. (1964) Inhibition of chymotrypsin activity in crystalline trypsin-preparations. J.Biol.Chem. 239, 1799
- Lämmli, V.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227, 680

- Leach, B.S., Collaen, J.F. and Fish, W.W. (1980) Behaviour of glycopeptides with empirical molecular weight. Estimation methods in SDS. *Biochem.* 19, 5734
- Levine, A.E. and Walsh, K.A. (1979) Involvement of an Acrosin-like enzyme in the acrosome reaction of sea urchin sperm. *Dev.Biol.* 72, 126
- Levine, A.E. and Walsh, K.A. (1980) Purification of an Acrosin-like enzyme from sea urchin sperm. *J.Biol.Chem.* 255, 4814
- Lin, T.Y. and Chang, Y.H. (1971) Hydrolysis of proteins with p-toluene-sulfonic acid. *J.Biol.Chem.* 246, 2842
- Linderström-Lang, K.V. (1952) Proteins and enzymes. In: Lane medical lectures 6, 1, Stanford University Publications, Stanford, California
- Lottspeich, F. (1980) Identification of the phenylthiohydantoin derivatives of amino acids by high pressure liquid chromatography using a ternary isocratic solvent system. *Z.Physiol.Chem.* 361, 1829
- Marshall, R.D. and Neuberger, A. (1964) Carbohydrates in protein. *Biochem.* 3, 1596
- Marushige, Y. and Marnshige, K. (1975) Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin. *Biochim.Biophys. Acta* 403, 180
- Marnshige, Y. and Marnshige, K. (1978) Dispersion of mammalian sperm chromatin during fertilization: An in vitro study. *Biochim.Biophys. Acta* 519, 1
- McLaughlin, P.J. and Dayhoff, M.C. (1972) Evolution of species and proteins: A time scale. In: Atlas of protein sequence and structure, Vol.5, 47, National Biomedical Research Foundation, Washington D.C.
- McRorie, R.A. and Williams, W.L. (1974) Biochemistry of mammalian fertilization. *Ann.Rev.Biochem.* 43, 777
- Meek, J.L. (1980) Prediction of peptide retention times in HPLC on the basis of amino acid composition. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 77, 1632

- Meizel, S. and Mukerji, S.K. (1975) Proacrosin from rabbit epididymal spermatozoa: Partial purification and initial biochemical characterization. Biol.Reprod. 13, 83
- Meizel, S. Lui, Ch.W. (1976) Evidence for the role of a trypsin-like enzyme in the sperm. J.Exp.Zool. 195, 137
- Meizel, S. and Mukerij, S.K. (1976) Biochemical studies of Proacrosin and Acrosin from hamster cauda epididymal spermatozoa. Biol.Reprod. 14, 444
- Metz, C.B. (1972) Effect of antibodies on gametes and fertilization. Fed.Proc. 32, 2057
- Michaels, S., Gallop, P.M., Klein, L. and Meilman, E. (1958) Studies on the specificity of collagenase. Biophys.Acta 29, 450
- Moghissi, K.S. and Syner, F.N. (1970) The effect of seminal protease on sperm migration through cervical mucus. Int.J.Fert. 15, 43
- Morton, D.B. (1975) Acrosomal enzymes: Immunochemical localization of acrosin and hyaluronidase in ram spermatozoa. J.Reprod.Fert. 45, 375
- Morton, D.B. (1976) Lysosomal enzymes in mammalian spermatozoa In: Dingle, J.T., Dean, R.T. (eds.) Lysosomes in biology and pathology Vol.5, 203 - 247
- Morton, D.B.M. (1977) In: Proteinases in mammalian cells and tissues (Barrett, A.J., ed.) 445 - 500, Elsevier/North Holland Biomedical Press
- Müller-Esterl, W. und Fritz, H. (1980) Interactions of boar Acrosin with detergents. Z.Physiol.Chem. 361, 1673
- Müller-Esterl, W., Kupfer, S. und Fritz, H. (1980) Purification and properties of boar Acrosin. Z.Physiol.Chem. 361, 1811
- Müller-Esterl, W., Zippel, B. und Fritz, H. (1980) Oligomerisation of boar acrosin. Z.Physiol.Chem. 361, 1381
- Müller-Esterl, W., Wendt, V., Leidl, W., Dann, O., Shaw, E., Wagner, G. und Fritz, H. (1983) Intra-acrosomal inhibitor of boar Acrosin by synthetic proteinase inhibitors. J.Reprod.Fert. 67, 13
- Mukerji, S.K. and Meizel, S. (1979) Rabbit testis Proacrosin. J.Biol.Chem. 254, 11721

- Naider, F. and Bohak, Z. (1972) Regeneration of methionyl residues from their sulfonium salts in peptides and proteins. Biochem. 11, No. 17, 3208
- Neuberger, A., Gottschalk, A., Marshall, R.D. and Spiro, R.G. (1972) Carbohydrate-peptide linkages in glycoproteins and methods for their elucidation. In: Gottschalk, A. (ed.) Glycoproteins Bd.A, Elsevier Publishing Company, Amsterdam London, New York, S. 450
- Neumann, N.P. (1972) Automated Edman degradation. The Protein sequenator. Meth.Enzymol. 27, 942
- Neurath, H. and Dixon, G.H. (1957) Structure and activation of trypsinogen and chymotrypsinogen. Fed.Proc. 16, 791
- Neurath, H. (1975) Limited proteolysis and zymogen activation. In: Reich, E., Rifkins, D.B. and Shaw, E. (eds.) Proteases and biological control, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., Vol. 2, 51
- Neurath, H. and Walsh, K.A. (1976) Role of proteolytic enzymes in biological regulation (A review). Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 73, 3825
- Palm, S., Schill, W.B., Wallner, O., Prinzen, R. und Fritz, H. (1976) Occurrence of components of the kallikrein-kinin-system in human genital tract secretions and their possible function in stimulation of sperm motility and migration. In: Kinins: Pharmacodynamics and biological roles (Sicuteri, F., Back, N., Haberland, G.L., eds.) Vol.70, 271
- Palmer, M.B. and Howarth, B., Jr. (1973) The requirement of a trypsin like acrosomal enzyme for fertilization in the domestic fowl. J.Reprod.Fert. 35, 7
- Penn, A. and Gledhill, B.L. (1972) Acrosomal proteolytic activity of amphibian sperm. Exp.Cell.Res. 74, 285
- Podell, D.N. and Abraham, G.N. (1978) A technique for the removal of pyroglutamic acid from the amino terminus of proteins using calf liver pyroglutamate amino peptidase. Biochem.Biophys.Res. Commun. 81, 176

- Polakoski, K.L. and Parrish, R.F. (1977) Boar Proacrosin. Purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated from ejaculated boar sperm. J.Biol.Chem. 252, 1888
- Schill, W.B. und Haberland, G.L. (1974) In vitro Untersuchungen zur Frage der Wirkung von Kallikrein und Kininen auf die Spermatozoenmotilität. Hautarzt 20, 245
- Schill, W.B. und Wolff, H.H. (1974) Acrosin activity and acrosome ultra-structure of human spermatozoa after freeze preservation. Naturwiss. 61, 172
- Schill, W.B., Heimbürger, H., Schiessler, H., Stolla, R. und Fritz, H. (1975) Reversible attachment and localization of the acid-stable seminal plasma acrosin-trypsin inhibitors on boar spermatozoa as revealed by the indirect immunofluorescent staining technique. Z.Physiol.Chem. 356, 1473
- Schill, W.B., Schleuning, W.-D., Fritz, H., Wendt, V. und Heimbürger, N. (1975) Immunofluorescent localization of acrosin in spermatozoa by boar acrosin antibodies. Naturwiss. 62, 540
- Schill, W.B. (1977) Die Bedeutung von Akrosin und Proteinase-Inhibitoren für die menschliche Fortpflanzung. Fortschr.Med. 95, 12, 790
- Schill, W.B., Feifel, M., Fritz, H. und Hammerskin, J. (1981) Inhibitors of acrosomal proteinase as antifertility agents: a problem of acrosomal membrane permeability. Int.J.Androl. 4, 25
- Schiessler, H., Fritz, H., Arnold, M., Fink, E. und Tschesche, H. (1972) Eigenschaften des Trypsin-ähnlichen Enzyms Akrosin aus Eberspermien. Z.Physiol.Chem. 353, 1638
- Schiessler, H., Schleuning, W.-D. und Fritz, H. (1975) Cleavage specificity of boar acrosin on polypeptide substrates, ribonuclease and insulin B-chain. Z.Physiol.Chem. 356, 1931
- Schleuning, W.-D. und Fritz, H. (1974) Some characteristics of highly purified boar sperm acrosin. Z.Physiol.Chem. 355, 125
- Schleuning, W.-D., Hell, R. und Fritz, H. (1976) Multiple forms of human acrosin: isolation and properties. Z.Physiol.Chem. 357, 855

- Schirren, C.G., Holstein, A.F. und Schirren, G. (1971) Über die Morphogenese rundköpfiger Spermatozoen des Menschen. *Andrologie* 3, 117
- Schroeder, W.A., Shelton, J.B. and Shelton, J.R. (1969) An examination of conditions for the cleavage of polypeptide chains with cyanogen bromide. *Arch.Biochem.Biophys.* 130, 551
- Schumacher, G.F.B. and Zaneveld, L.J.D. (1974) Proteinase inhibitors in human cervical mucus and their in vivo interaction with human acrosin. In: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. and Truscheit, E. (eds.) *Bayer-Symposium V, Proteinase-Inhibitors*, S. 178 - 186, Springer-Verlag, Berlin
- Shams-Borhan, G. and Harrison, R.A.P. (1981) Production, characterization and use of ionophore-induced, calcium-dependent acrosome reaction in ram spermatozoa. *Gamete Res.* 4, 407
- Shaw, E., Mares-Guia, M. and Cohen, W. (1965) Evidence for an active-center histidin in trypsin through use of a specific reagent 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone. *Biochem.* 4, 2219
- Sigler, P.B., Blow, D.M., Matthews, B.W. and Henderson, R. (1968) Structure of crystalline α -chymotrypsin II. A preliminary report including a hypothesis for the activation mechanism. *J. Mol.Biol.* 35, 143
- Spackman, D.H., Stein, W.H. and Moore, S. (1958) Automatic Recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal.Chem.* 30, 1190
- Srivastava, P.N., Adams, C.E. and Hartree, E.F. (1965) Enzymic action of acrosomal preparations on the rabbit ovum in vitro. *J.Reprod.Fert.* 10, 61
- Stambaugh, R. and Buckley, J. (1968) Zona pellucida dissolution enzymes of the rabbit sperm head. *Science* 161, 585
- Stambaugh, R. and Buckley, J. (1969) Identification and sub-cellular localization of the enzymes effecting penetration of the zona pellucida by rabbit spermatozoa. *J.Reprod.Fertil.* 19, 423
- Stambaugh, R., Brackett, B.G. and Mastroianni, L. (1969) Inhibition of in vitro fertilization of rabbit ova by trypsin inhibitors. *Biol.Reprod.* 1, 223

- Stambaugh, R. and Buckley, J. (1972) Histochemical subcellular localization of the acrosomal proteinase effecting dissolution of the zona pellucida using fluorescein-labeled inhibitors. Fertil.Steril. 23, 348
- Stambaugh, R. and Smith, M. (1974) Amino acid content of rabbit acrosomal proteinase and its similarity to human trypsin. Science 186, 745
- Stambaugh, R., Smith, M. and Foltas, S. (1975) An organized distribution of acrosomal proteinase in rabbit sperm acrosomes. J.Exp.Zool. 193, 112
- Stambaugh, R. and Smith, M. (1976) Sperm proteins release during fertilization of ova. J.Exp.Zool. 197, 121
- Steitz, T.H., Henderson, R. and Blow, D.M. (1969) Structure of crystalline α -chymotrypsin. III Crystallographic studies of substrates and inhibitors. J.Mol.Biol. 46, 337
- Stephens, B.G., Felkel, H.L., Jr. and Spinelly, W.A. (1974) Spectrophotometric determination of copper and iron. Anal. Chem. 46, 692
- Steven, F.S., Griffin, M.M., Chantler, E.N. (1982) Inhibition of human and bovine sperm acrosin by divalent metal ions. Possible role of zinc as a regulator of acrosin activity. Int.J.Androl. 5, 401
- Stroud, R.M., Kay, L.M. and Dickerson, R.E. (1974) The structure of bovine trypsin. Electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Å and 2,7 Å resolution. J.Mol.Biol. 83, 185
- Stroud, R.M., Krieger, M., Koeppl, R.E., Kossiakoff, A.A. and Chambers, J.L. (1975) Structure-funktion relationships in the serine proteases. In: Reich, E. et al. (eds.) Proteases and biological control, Cold Spring Harbor 93, 13
- Suominen, J., Kaufman, M.H. and Setchell, B.P. (1973) Prevention of fertilization in vitro by an acrosin inhibitor from rete testis fluid of the ram. J.Reprod.Fert. 34, 385
- SuHou, M.R., Fall, R.R., Nervi, A.M., Alberts, A.W., Vagelos, P. R. and Bradshaw, R.A. (1977) Amino acid sequence of Escherichia coli biotin carboxyl carrier protein (9 100). J.Biol.Chem. 252, 3934

- Tarr, G.E., Beecher, I.F., Bell, M. and McKean, D.J. (1978) Polyquarterinary amines prevent peptide loss from sequenators. Anal. Biochem. 84, 622
- Tschesche, H., Kupfer, S., Lengel, O., Klauser, R., Meier, M. und Fritz, H. (1974) Purification, characterization and structural studies of proteinase inhibitors from boar seminal plasma and boar spermatozoa. In: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. und Truscheit, E. (eds.) Bayer-Symposium V, Proteinase Inhibitors, 164 - 177, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York
- Tschesche, H., Wittig, B., Decker, G., Müller-Esterl, W., Fritz, H. (1982) A new acrosin inhibitor from boar spermatozoa. Eur.J.Biochem. 126, 99
- Vanderkerckhove, J.S. and van Montagu, M.C. (1977) Sequence of the H-protein of coliphage MS2. J.Biol.Chem. 252, 7773
- Vesterberg, O. (1971) Isoelectric focusing of proteins. Meth. Enzymol. 22, 389
- Waldschmidt, M., Hoffmann, B. und Karg, H. (1966) Untersuchungen über die tryptische Enzymaktivität in Geschlechtssekreten von Bullen. Zuchthygiene 1, 15
- Weber, K. and Osborn, M. (1975) In: Neurath, H. and Hill, R. (eds.) The proteins Vol. 1, 179 - 223, Academic Press, New York
- Wendt, V., Leidl, W., Fritz, H. (1975) The lysis effect of bull spermatozoa on gelatin substrate film. Methodical investigations. Z.Physiol.Chem. 356, 315
- Wittmann-Liebold, B., Graffunder, H. und Kohls, H. (1976) A device coupled to a modified sequenator for the automated conversion of anilinothiazolinones into PTH amino acids. Anal. Biochem.Biophys.Res.Comm. 81, 176

Yamane, J. (1930) The proteolytic action of mammalian spermatozoa and its bearing upon the second maturation division of ova. *Cytologia* 1, 394

Yamane, J. (1935) Kausal-analytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies. *Cytologia* 6, 233

Young, C.L., Barker, W.C., Tomaselli, C.M. and Dayhoff, M.O. (1978) In: Atlas of protein, sequence and structure, Serin-proteinases, Vol. 5, Suppl. 3, 74, National Biomedical Research Foundation, Washington D.C.

Young, R.J. (1979) Rabbit sperm chromatin is decondensed by a thiol-induced proteolytic activity not endogenous to its nucleus. *Biol.Reprod.* 20, 1001

Zaneveld, L.J.D., Srivastava, P.V. and Williams, W.L. (1969) Relationship of a trypsin-like enzyme in rabbit spermatozoa to capacitation. *J.Reprod.Fertil.* 20, 337

Zaneveld, L.J.D. and Williams, W.L. (1970) A sperm enzyme that disperses the corona radiata and its inhibition by decapacitation factor. *Biol.Reprod.* 2, 363

Zaneveld, L.J.D., Robertson, R.T. and Williams, W.L. (1970) Synthetic enzyme inhibitors as antifertility agents. *FEBS Lett.* 11, 345

Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L., Travis, J. and Williams, W.L. (1970) Purification and properties of a trypsin-like enzyme (TLE) isolated from rabbit sperm acrosomes. In: Proc.3rd Ann. Meeting of the Society for the study of Reproduction, p. 7

Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L., Robertson, R.T. and Williams, W.L. (1971) Trypsin inhibitors and fertilization. In: Proc. Int.Res. Conf. on proteinase inhibitors, Munich 1970 (Fritz, H., Tschesche, H., eds.) p. 236, Walter de Gruyter, New York

Zaneveld, L.J.D., Robertson, R.T., Kessler, M. and Williams, W.L. (1971) Inhibition of fertilization in vivo by pancreatic and seminal plasma inhibitors. *J.Reprod.Fert.* 25, 387

- Zaneveld, L.J.D., Schumacher, G.F.B., Tauber, P.F. and Propping, D. (1974) Proteinase inhibitors and proteinase of human semen. In: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. and Truscheit, T. (eds.) Bayer-Symposium V, Proteinase Inhibitors, S. 136 - 146, Springer-Verlag, Berlin
- Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L. and Schumacher, G.F.G. (1975) The proteolytic enzyme systems of a mammalian genital tract secretion and spermatozoa. In: Reich, E., Rifkin, D.B., Shaw, E. (eds.) Proteases and biological control, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., S. 683
- Zelezňá, B. and Cechová, D. (1982) Boar acrosin: Isolation of two active forms from boar ejaculated sperm. Z.Physiol.Chem. 363, 757
- Zirkin, B.R. and Chang, T.S.K. (1977) Involvements of endogenous proteolytic activity in thiol-induced release of DNA template restrictions in rabbit sperm nuclei. Biol.Reprod. 17, 131

LEBENS LAUF

23.5.1952	geboren in Nittenau als zweites Kind von Max Fock und Barbara Fock, geb. Schwabenbauer
1958 - 1962	Besuch der Volksschule in Nittenau
1962 - 1971	Besuch des Regental-Gymnasiums in Nittenau
19.6.1971	Reifeprüfung
bis 1972	Praktikum für Apotheker in der Marienapotheke in Nittenau
1972 - 1973	Studium der Pharmazie an der Phil. Theol. Hochschule Bamberg
1973 - 1976	Studium der Pharmazie an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen
27.11.1974	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
12.11.1976	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
1.2.1977	Beginn des Praktikums für Apotheker in der Apotheke am Romanplatz in München
30.6.1977	Eheschließung mit Dr. Klaus Nüzell
1.2.1978	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
15.2.1978	Approbation als Apotheker
ab 1.5.1979	Durchführung der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Frau Dr. Henschen am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München
April - Oktober 1982	Beurlaubung
Mai 1983	Beendigung der Dissertation

